R 3966

# HALIOTIS

VOL. 27
1997 (1998)

issn 0397.765 x

SOCIETE FRANÇAISE DE MALACOLOGIE

***Haliotis***, revue de la Société Française de Malacologie, est ouverte à des articles originaux couvrant tous les aspects de l'étude des Mollusques. Son rythme de parution est en principe annuel, avec un ou plusieurs fascicules.

La soumission d'un manuscrit à *Haliotis* sous-entend qu'il n'est pas publié ou sous presse ailleurs. Les auteurs qui désireront utiliser ultérieurement des matériaux publiés dans *Haliotis* devront préalablement obtenir la permission de la S.F.M.

**Soumission des manuscrits**

Les textes doivent être saisis sous un traitement de texte d'usage courant. Il sera soumis dans un premier temps deux exemplaires tirés sur format A4 avec double interligne, ainsi que l'original et deux copies des illustrations. Les manuscrits sont à adresser au secrétariat général de la S.F.M., 55 rue Buffon, 75005 Paris, ou à un des membres du comité de rédaction.

Le manuscrit sera lu par un ou plusieurs spécialistes choisi(s) par le comité de rédaction, dont les commentaires seront adressés à l'auteur (sous forme anonyme ou non au choix du rapporteur). L'auteur a l'obligation de prendre en considération les commentaires du rapporteur et adressera s'il y a lieu une version révisée ainsi qu'une copie de la disquette de texte. Le comité de rédaction prendra, au vu des commentaires du rapporteur, une décision d'acceptation ou de refus du manuscrit.

**Organisation du texte**

- titre concis et informatif: pensez qu'il doit servir à l'indexation. Si le titre contient un nom de genre ou d'espèce peu connu, ce nom sera accompagné du nom d'un taxon supraspécifique
- prénoms (en entier) et noms des auteurs
- adresses des auteurs.
- "abstract" en Anglais, précédé du titre en Anglais.
- résumé (dans la langue du texte de l'article; en Français si l'article est écrit dans une autre langue) exposant les principaux résultats, mais pas de descriptions de taxa nouveaux éventuellement introduits dans l'article.
- texte proprement dit comprenant, dans cet ordre, Introduction, Matériel et méthodes, Résultats, Discussion, Conclusions, Remerciements, Bibliographie.

Les niveaux hiérarchiques de sous-titres seront limités le plus possible. Les sous-titres ne seront en aucun cas numérotés.

**Illustrations**

Seules les illustrations en noir et blanc seront prises en charge par la revue. Le surcoût des illustrations en couleur sera à la charge des auteurs.

Les illustrations doivent être de bonne qualité, prêtes à cliché. Les dessins seront de préférence réalisés à une dimension supérieure à leur taille finale, et seront accompagnés d'une photocopie réduite à la taille finale désirée par l'auteur. La dimension des lettrages utilisés devra tenir compte de cette réduction et leur taille une fois réduite sera au moins de 1,5 mm. Pour les tableaux et graphiques, des tirages d'imprimante laser ou à jet d'encre sur papier sont acceptables comme originaux. Les cartes devront faire figurer des coordonnées géographiques et avoir un cadre.

Les photographies seront montées avec leurs lettrages définitifs, à la dimension sous laquelle elles doivent être publiées. Les planches photographiques mesurent au maximum 16,5 x 23 cm.

Toutes les figures doivent être numérotées en une série unique, qu'il s'agisse de dessins, de photographies montées en planche ou de graphiques. Les tableaux (comportant exclusivement du texte ou des chiffres, à l'exclusion de graphiques) seront numérotés en une autre série. Les légendes des figures et des tableaux seront regroupées sur une feuille à part, et copiées également dans la disquette. Les auteurs pourront indiquer dans le texte la position souhaitée des figures et tableaux.

*(suite sur la 3e page de couverture)*

Pr 3966

# Ecophysiological study of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* naturally infected by a *Chlamydia*-like microorganism: effect of infection level and diet on oyster physiological responses

*Patrick SOLETCHNIK [1], Philippe GOULLETQUER [1], Nathalie COCHENNEC [2], Tristan RENAULT [2] and Philippe GEAIRON [1]*

RÉSUMÉ

**Etude écophysiologique de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* infectée naturellement par un microorganisme de type *Chlamydia*: effets du niveau d'infection et du régime alimentaire sur la réponse physiologique de l'huître.**

Une population d'huîtres japonaises, *Crassostrea gigas*, infectée par un procaryote de type *Chlamydia* a été élevée pour comparer l'évolution de l'infection sous trois régimes alimentaires: le jeûne, un régime intermédiaire à base de *Skeletonema costatum*, et un régime mixte de microalgues. Plusieurs critères physiologiques et pathologiques: présence d'anomalies de la branchie; examen microscopique, inclusions intracytoplasmiques basophiles, réaction de Feulgen; indice de condition, filtration, consommation de nourriture; production de fèces et respiration ont été utilisés pour comparer les différentes modalités trois mois après le début de l'expérience. Les huîtres maintenues à jeun présentent des performances physiologiques inférieures en termes de croissance et d'indice de condition, comparées à celles nourries avec *Skeletonema costatum*, ou avec le mélange de *Isochrysis galbana* (souche Tahitienne), *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans* et *Pavlova lutherii*.

Un indice de condition de 7,4 reflétait un stade de maturation avancée dans la population nourrie avec le mélange de microalgues. Quoique infectées par un microorganisme de type *Chlamydia* les deux populations nourries avaient des réponses physiologiques remarquables (bons indices de condition et potentiels de croissance positifs).

Le potentiel de croissance a été comparé à la production effective en tenant compte de la maturation et du stade de pré-ponte des huîtres. Une corrélation positive a été établie entre les anomalies branchiales et le taux de filtration pour les huîtres à jeun et celles nourries avec *Skeletonema*. Dans les populations infectées par le microorganisme de type *Chlamydia*, les estimations de filtration sont un meilleur indicateur pour les taux d'infection élevés, que les mesures physiologiques effectuées (respiration, production de fèces par exemple) ou estimées (taux d'absorption, potentiel de croissance) physiologiques. En conséquence, la relation entre critères pathogènes et mesures physiologiques peut être utilisée pour une estimation de l'infestation. Toutefois, une identification spécifique des agents pathogènes est nécessaire, dans une étape suivante, pour une estimation quantitative des effets pathogènes.

[1] IFREMER /URAPC Genetic, Aquaculture and Pathology Laboratory (GAP). BP 133 - F-17390 La Tremblade.
[2] IFREMER /URPIG Genetic, Aquaculture and Pathology Laboratory (GAP). BP 133 - F-17390 La Tremblade.

BIBL. DU MUSÉUM PARIS

Bibliothèque Centrale Muséum
3 3001 00033746 8

## ABSTRACT

A population of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, infected with a *Chlamydia*-like procaryote was reared to compare infection trends under three different feeding conditions: a starved condition, an intermediate condition with a diet of *Skeletonema costatum*, and a mixed algal diet. Several physiological and pathological criteria: presence of gill abnormality; microscopic examination, basophilic intracytoplasmic inclusions, Feulgen reaction; condition index, filtration, food consumption; fecal production and respiration were used to compare the various modalities one month after the initiation of the experiment. The modality of starved oysters showed reduce physiological performances in terms of scope for growth and condition index compared to oysters fed *Skeletonema costatum*, or a mixed diet of *Isochrysis galbana* (Tahitien strain), *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans* and *Pavlova lutherii*.

A condition index of 7.4 reflected a prespawning stage in the population fed with a diet of mixed algae. Although infected with a *Chlamydia*-like microorganism, impressive physiological responses (good condition index and positive scope for growths) were reported for both fed oyster populations. The scope for growth values compared to effective production were discussed with regard to the maturation process and the pre-spawning stage of the oysters.

A positive linear relationship was established between gill abnormalities and filtration rate for starved and *Skeletonema* fed oysters. In populations known to be infected with the *Chlamydia* - like organism examined in this study, clearance rate estimates represent a better bioindicator for high infection level than compared to either physiological measurements (e.g., respiration, feces production) or estimates (e.g., absorption rate, scope for growth). Thus, the relationship between pathological criteria and physiological measurements can be used to estimate pathogen diagnosis. However, specific pathogen identifications should be carried out as a further step to quantitatively assess pathogen effects.


## INTRODUCTION

Mortalities resulting from the effect of prokaryotic parasites have been reported in many species of bivalve: *Donax trunculus* by Comps and Raimbault (1978), *Tellina tenuis* by Buchanan (1978), *Placopecten magellanicus* by Gulka *et al.* (1983), *Siliqua patula* by Elston (1986), *Pecten maximus* by Le Gall *et al.*, (1988). However, the relationship between parasite infection and its effect on physiological functions have rarely been described (Newell; 1985; Le Gall *et al.*,1991). Newell (1985) reported a significant reduction in feeding rate of *Crassostrea virginica* infected with the MSX parasite, *Haplosporidium nelsoni*. Moreover, Le Gall *et al.*,(1991), pointed out the energetic loss due to rickettsia infection in *Pecten maximus*.

This study was designed to test the capacity of oyster *Crassostrea gigas* to recover from a *Chlamydia*-like organism infection. Three oyster groups were each fed a different diet. The experimental oyster population, originated from the Marennes-Oléron Bay (France), was naturally infected with a *Chlamydia*-like organism. Infection recovery was evaluated using whole animal physiological measurements and gross and histo pathological examination of gills and mantle tissues.

## MATERIALS AND METHODS

### *Experimental set up*

Two year old oysters were collected from 'Le Chapus' in the mid-part of Marennes-Oléron Bay, divided into three groups and reared in a closed raceway system. No food was provided to the first group (ST). Two additional groups were fed *ad libitum*. Oysters from the second group (DS) were fed *Skeletonema costatum* four times a day cultured in 300 $m^3$ tanks. A mixed diet (DM) of cultured algae including *Isochrysis galbana* (Tahitien strain), *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans* and *Pavlova lutheri* was provided to the third oyster batch. The closed system is based on a continuous seawater circulation through biological filters, which induced a 1 mg $ml^{-1}$ organic matter production in the raceways. Although limited, the food distribution required a regular seawater input into the raceways. Temperature ranged from 14°C to 20°C, with a 16.4°C average during the feeding management lasting from April 24 to May 25. The experimental setup was described in detail by Barillé *et al.*, (1993).

*Sea water and oyster biodeposits sampling*

The experimental set up included 12 individual chambers. Ten chambers were used with oysters for physiological measurements and 2 chambers, without oysters as control to estimate inflow seawater characteristics (POMe) (figure 1). Seawater temperature was constant during the physiological measurements (15°C). Hydrological measurements were estimated in triplicate. Total particulate matter (TPM) was estimated by filtering seawater on Whatman GF/C filters and then dried at 60°C before weighing. Particulate organic (POM) and inorganic matter (PIM) were estimated by weighing after ignition at 450°C (Razet *et al.*, 1990). The seawater characteristics remained constant throughout the experiments. Mean seston load was maintained below the pseudofeces production threshold (4.6 mg $l^{-1}$) (Deslous-Paoli *et al.*, 1992).

Each oyster was glued on a division to facilitate feces and pseudofeces sampling (figure 1). Biodeposits were collected every 2 hours. Feces production were delayed by considering the gut transit time (35 min) (Soletchnik *et al.*, 1996).

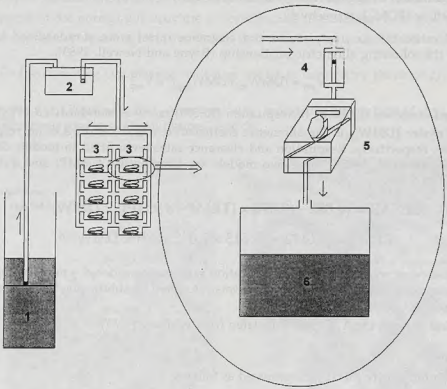



Figure 1. Experimental setup: 1, Algal (*Tetraselmis suecica*) reservoir; 2, Mixing tank; 3, set of measurement chamber; 4, flowmeter; 5, detail of a measurement chamber with oyster; 6 outflowing water collect tank.

*Oyster biometry and proximate biochemical composition*

Once the experiment was completed, the oysters were shucked. After freezing and then freeze-drying for 36 hours, meat were weighed (DMW) individually to the nearest 0.01 mg. Dry shell (DSW) was weighted to the nearest 0.1 g. Proximate biochemical analyses were then performed on the dry oyster meat. Carbohydrates (CARB) and glycogen (GLYC) concentrations were analyzed using the method of Dubois *et al.*, (1956), proteins (PROT), using the Lowry *et al.*, (1951) method. After extraction (Bligh and Dyer, 1959), lipids (LIPI) were analyzed using the method of Marsh and Weinstein (1966).

***Physiological functions***

Physiological measurements as well as further pathological analysis were carried out individually on 24 oysters per treatment (ST, DS, DM). Clearance rates were estimated using the total sea water volume flowing through the experimental set-up to allow precise particulate matter concentration estimates (figure 1). Respiration rates were estimated using oxymetric Orbisphere probes (Orbisphere laboratories). The Walne and Mann (1975) condition index (CONDI) was calculated as:

$$CONDI = 100 \cdot DMW / DSW.$$

Consumption rate (mg $h^{-1}$) (CONSU) was calculated using :

$$CONSU = Vol \cdot (POM_i - POM_o) / t \cdot 60$$

where, Vol represented the total volume of seawater collected during the experimental time; POM was the concentration of organic matter in control' seawater (inflow) ($POM_i$) and experimental chambers' outflow ($POM_o$), respectively.

Physiological estimates (i.e., respiration and clearance rates) were standardized to dry meat weight using the following allometric relationship (Bayne and Newell, 1983):

$$V_{std} = (DMW_{std}/DMW_{exp})^b \times V_{exp}$$

$V_{exp}$, measured clearance (CLEAR) or respiration (RESPI) rate was standardized ($V_{std}$) to a 1g dry meat weight oyster ($DMW_{std}$). The allometric coefficient b was 0.8 and 0.439 for respiration and clearance rates, respectively. Respiration and clearance rates were fitted to models developed by Bougrier (Bougrier *et al.*, 1995). These two models are temperature (TEMP) and weight (DMW) dependant:

$$CLEAR = [4.825 - (0.013 \times (TEMP-18.954)^2)] \times DMW^{0.439}$$

$$RESPI = [-0.432 + (0.613 \times 1.042^{TEMP})] \times DMW^{0.8}$$

Since no pseudofeces were produced, consumption rate was considered similar to ingestion rate. Therefore, the organic absorption A (mg $h^{-1}g^{-1}$) was calculated by subtracting the organic portion of the feces F (mg $h^{-1}g^{-1}$) from the POM consumed.

Absorption rate (%) was the A/C ratio calculated from Winberg (1957).

***Energetic budget***

The scope for growth (SFG) was estimated as follows:

$$SFG = A - RESPI$$

The energy balance was calculated using POM from *Tetraselmis* sp in natural filtered seawater. This represents the 'standard water' for physiological measurements (Widdows, 1985).

Energetic conversion factors were 17 J $mg^{-1}$ and 0.45 J $\mu mole^{-1}$ for *Tetraselmis suecica* and oxygen respectively (Romberger and Epifanio, 1981; Whyte, 1987). Shell energy was equivalent to 0.21 J $mg^{-1}$ (Dame, 1972) and dry meat weight to 20.18 J $mg^{-1}$ (Héral and Deslous-Paoli, 1983). Moreover, Deslous-Paoli and Héral (1980) estimated the gonad conversion factor to 20.39 J $mg^{-1}$

*Pathology*

From the initial stock of oysters, the occurrence of basophilic irregular intracytoplasmic inclusion bodies, in gill and mantle connective tissue, was 59% in March 1993.

After completion of physiological measurements, gross examination and pathological sampling for histological analyses were systematically carried out on the oysters.

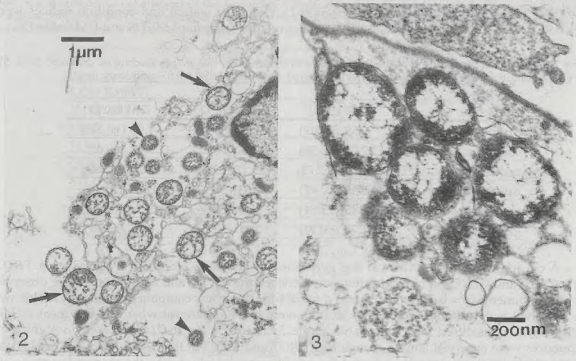
Gills and mantle samples tissues were fixed using Davidson's fluid, then embedded in paraffin for further histological examination. The 3 nm tissue sections were stained by Hematoxylin-Eosin or by nucleal Feulgen reaction, then checked for lesions using a photomicroscope.

Five different types of abnormalities were then detected. The first one was described by gross examination and the others using histological analysis.

The variable (MACRO) represented abnormalities detected by gross examination. Paraffin sections stained in Hematoxylin and eosin or by nucleal Feulgen reaction showed four different abnormalities:

- Mass hemocytic cellular infiltration in connective tissues of several organs (HEMIN).
- Drastic changes of the normal gill structure in several areas like filament fusion (GABNO).
- Irregular, basophilic cytoplasmic inclusion bodies in connective tissue of gills and mantle (BASIN).
- Irregular Feulgen positive cytoplasmic inclusion bodies in connective tissue of gills and mantle (FEULG).

Moreover, the *Chlamydia*-like infection was individually confirmed by transmission electronic microscopic analysis (TEM) (figures 2 and 3).




Figures 2-3. Transmission electron micrographs of *Crassostrea gigas* gill tissues. 2: A gill cell infected with *Chlamydia* - like organism: reticulate bodies (arrows) and intermediate condensing (arrowheads). *Bar: 1 µm.* 3: Transmission electron micrograph of *Crassostrea gigas* gill tissues. Details of reticulate bodies. *Bar: 200 nm.*

***Statistical analysis***

Physiological responses were compared using Chi squared tests (Schwartz, 1963). A correlation matrix was calculated using the following variables:

- pathological variables: basophilic inclusions (BASIN), nucleal Feulgen reaction (FEULG), gill abnormalities detected by using both photomicroscope (GABNO), and macroscopical observation (MACRO).

- biometric variables: dry meat weight (DMW, g), dry shell weight (DSW, g), condition index (CONDI).

- physiological variables: respiration (RESPI, mg $O_2$ $h^{-1}$), clearance rate (CLEAR, $l^{-1}$), consumption rate (CONSU, mg POM $h^{-1}$), feces production (FECES, mg $h^{-1}$).

Variance of the main biological components was calculated to compare feeding treatments (ANOVA). The dry meat weight (DMW) (or the dry shell weight DSW) was as a covariable.

Then, a multivariate analysis, (Principal Component Analysis, PCA), based on the previous correlation matrix was performed to consider simultaneously physiological and pathological data. The main objective was to assess the contribution of each variable in terms of variabilities as to estimate relationships among descriptors. The second objective was to discriminate oyster groups based upon physiological and pathological criteria.

## RESULTS

***Oyster biometry and proximate biochemical composition***

One characteristic of the oyster population resulting from the DM diet was an increased shell growth and sexual maturity for almost 90% of the individuals. Condition index of the DM group was three times greater than starved oysters (ST). Dry meat weight and condition indices were 0.59, 0.91, 1.93 g and 2.74 %, 4.36 %, 7.41 %, respectively for the groups ST, DS and DM (table 1).

Table 1. Biochemical composition of the three groups of oysters after one month feeding on different diets. ST: starvation condition; DS: *Skeletonema costatum*; DM: mixed algal diet. (±CL): ± 0.05 confidence limits.

| Diets | ST (±CL) | DS (±CL) | DM (±CL) |
|---|---|---|---|
| dry meat weight (g) | 0.59 (±0.09) | 0.91 (±0.11) | 1.93 (±0.17) |
| condition index | 2.74 (±0.38) | 4.36 (±0.31) | 7.41 (±0.62) |
| proteins (%) | 28.24 (±2.75) | 25.27 (±2.09) | 29.44 (±3.82) |
| lipids (%) | 8.48 (±0.97) | 9.63 (±1.13) | 12.37 (±1.66) |
| carbohydrates (%) | 4.15 (±1.31) | 5.92 (±0.96) | 3.39 (±0.47) |
| glycogen (%) | 1.77 (±0.92) | 2.11 (±0.77) | 0.57 (±0.29) |

A covariance analysis (Ancova) was performed for the main biochemical components: PROT, LIPI, CARB and GLYC. Significant differences between the ST, DS and DM groups, were observed for all components ($p = 0.05$ for GLYC and $p = 0.001$ for the others components). The covariable was the dry shell weight (table 2; figure 4). Results were more significant when the dry meat weight (DMW) was considered as a covariable (table 3; figure 5). In the latter case, no significant differences were observed among groups with PROT and LIPI, but the CARB and GLYC at 1% and 5% threshold level respectively, reflected the use of carbohydrate during the maturation processes of the DM oyster group. The covariable effect (DMW or DSW) was significant for each biochemical compound.

Table 2. Covariance analysis of the various biochemical analysis (variables: PROT: protein, LIPI: lipid, CARB: carbohydrate, GLYC: glycogen) of oysters dry meat for the three treatments (ST: starvation condition; DS: *Skeletonema costatum;* DM: mixed algal diet). The covariable is the dry shell weight (DSW).

| | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F. ratio | Sig. level |
|---|---|---|---|---|---|
| COV [DSW] | 0.319 | 1 | 0.319 | 12.45 | 0.0008 |
| V [PROT] | 1.375 | 2 | 0.687 | 26.84 | 0.0000 |
| residual | 1.716 | 67 | 0.025 | | |
| total | 4.233 | 70 | | | |
| COV[DSW] | 0.074 | 1 | 0.074 | 15.64 | 0.0002 |
| V[LIPI] | 0.281 | 2 | 0.140 | 29.39 | 0.0000 |
| residual | 0.320 | 67 | 0.004 | | |
| total | 0.849 | 70 | | | |
| COV [DSW] | 0.005 | 1 | 0.006 | 8.59 | 0.0046 |
| V [CARB] | 0.013 | 2 | 0.006 | 10.02 | 0.0002 |
| residual | 0.044 | 67 | 0.0006 | | |
| total | 0.067 | 70 | | | |
| COV [DSW] | 0.0014 | 1 | 0.0014 | 5.60 | 0.021 |
| V [GLYC] | 0.0018 | 2 | 0.0009 | 3.60 | 0.032 |
| residual | 0.0173 | 67 | 0.0003 | | |
| total | 0.0199 | 70 | | | |

Table 3. Covariance (COV) analysis of the various biochemical analysis (variables: PROT: protein, LIPI: lipid, CARB: carbohydrate, GLYC: glycogen) of oysters dry meat for the three treatments (ST: starvation condition; DS: diet on *Skeletonema costatum;* DM: mixed algal diet). The covariable is the dry meat weight (DMW).

| | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F. ratio | Sig. level |
|---|---|---|---|---|---|
| COV [DMW] | 1.136 | 1 | 1.135 | 84.80 | 0.000 |
| V [PROT] | 0.030 | 2 | 0.015 | 1.21 | 0.331 |
| residual | 0.898 | 67 | 0.013 | | |
| total | 4.233 | 70 | | | |
| COV[DMW] | 0.244 | 1 | 0.244 | 109.3 | 0.000 |
| V[LIPI] | 0.004 | 2 | 0.002 | 0.89 | 0.413 |
| residual | 0.150 | 67 | 0.002 | | |
| total | 0.849 | 70 | | | |
| COV [DMW] | 0.017 | 1 | 0.017 | 36.9 | 0.000 |
| V [CARB] | 0.007 | 2 | 0.003 | 7.57 | 0.001 |
| residual | 0.031 | 67 | 0.0004 | | |
| total | 0.067 | 70 | | | |
| COV [DMW] | 0.0014 | 1 | 0.0014 | 5.44 | 0.022 |
| V [GLYC] | 0.0024 | 2 | 0.0012 | 4.72 | 0.012 |
| residual | 0.0174 | 67 | 0.0002 | | |
| total | 0.0200 | 70 | | | |

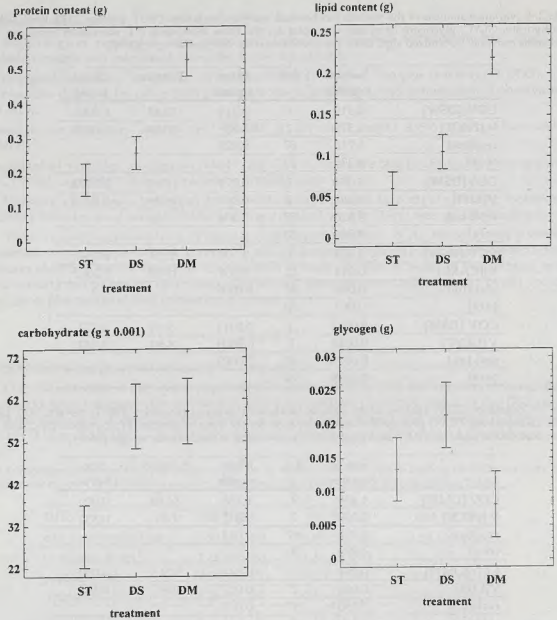



Figure 4. Mean and confidence limits of the biochemical components of oysters dry meat (protein, lipid, carbohydrate, glycogen) for the three treatments (ST: starvation condition; DS: *Skeletonema costatum;* DM: mixed algal diet). The covariable is the dry shell weight.

***Physiological responses***

The covariance analysis of clearance and respiration showed no significant differences among the groups of oysters fed the three diets (ST, DS, DM) (table 4, figure 6). The respiration rates were significantly correlated to the DMW covariable.

Total particulate matter concentration was 4.09 mg $l^{-1}$, below the pseudofeces production threshold. Organic matter content reached 73%. The average 3.19 $l^{-1}g^{-1}$ clearance rate was lower for DM treatment compared to others. In contrast, organic consumption rate (5.75 mg $h^{-1}g^{-1}$ ) for DS treatment was significantly higher than for the others. The 0.39 and 0.40 absorption rates were similar for DS and DM conditions.

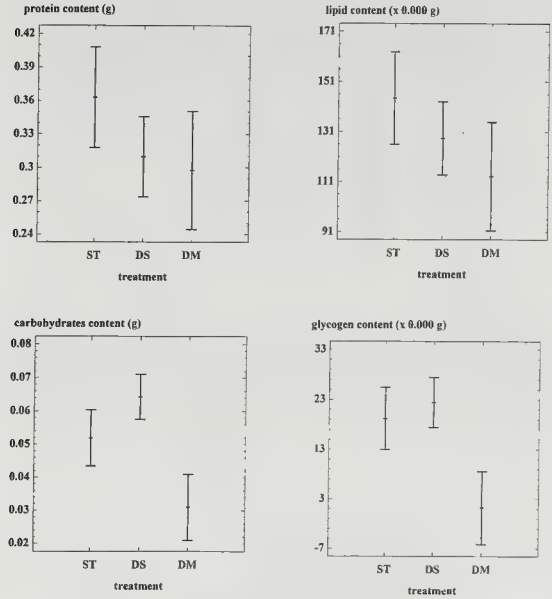



Figure 5. Mean and confidence limits of the biochemical components of oysters dry meat (protein, lipid, carbohydrate, glycogen) for the three treatments (ST: starvation condition; DS. *Skeletonema costatum*, DM mixed algal diet). The covariable is the dry meat weight.

Organic matter absorption reached 2.22 mg $h^{-1}$ $g^{-1}$ and 1.19 mg $h^{-1}$ $g^{-1}$ for treatment DS and DM, respectively. A negative absorption rate reflected the reduced oyster physiological condition in treatment ST. The standard metabolism, ranged from 10-13 J $h^{-1}$ $g^{-1}$, was not different among the three treatments (table 3). While scope for growth was negative in treatment ST, it reached 25 and 10 J $h^{-1}$ $g^{-1}$ for treatment DS and DM, respectively, without statistical significant differences Moreover, the -22 J $h^{-1}$ $g^{-1}$ negative scope for growth demonstrated the poor condition of oysters subject to ST treatment.

Table 4. Covariance analysis of the clearance rate (CLEAR) and respiration (RESPI) of oysters for the three treatments (ST: starvation condition; DS diet on *Skeletonema costatum*, DM. mixed algal diet) COV covariance, V variance. The covariable (COV) is the dry meat weight (DMW)

| | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F. ratio | Sig. level |
|---|---|---|---|---|---|
| COV [DMW] | 0.115 | 1 | 0.115 | 0.100 | 0.75 |
| V [FILT] | 0.225 | 2 | 0 113 | 0.098 | 0 91 |
| residual | 68.08 | 59 | 1.15 | | |
| total | 68.44 | 62 | | | |
| COV[DMW] | 0.844 | 1 | 0.844 | 10.33 | 0.002 |
| V[RESPI] | 0.208 | 2 | 0.104 | 1.27 | 0.287 |
| residual | 4.820 | 59 | 0.081 | | |
| total | 11.40 | 62 | | | |

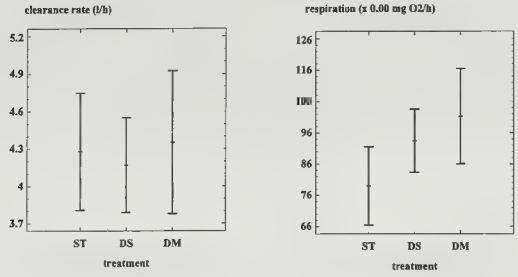



Figure 6 Mean and confidence limits of the clearance rate and respiration of oysters for the three treatments (ST starvation condition; DS: *Skeletonema costatum*; DM mixed algal diet). The covariable (COV) is the dry meat weight (DMW).

Comparisons between model outputs and our clearance and respiration rate measurements are reported in figures. 7 and 8. Three groups were discriminated: ST and DS measurements were well fitted .o the respiration model. In contrast, most of the measured respiration rates for treatment DM were below the calculated values (figure 7). With regards to clearance rate measurements, three groups were observed along an horizontal axis (figure 8). However, most of the oyster responses from the group ST were correctly fitted to the model A group of oysters was characterized by a significantly higher clearance rate than model estimates. Moreover 80% of these oysters were characterized by gill abnormalities under histological observations (GABNO) and included half of the oysters showing this pathological criterion.

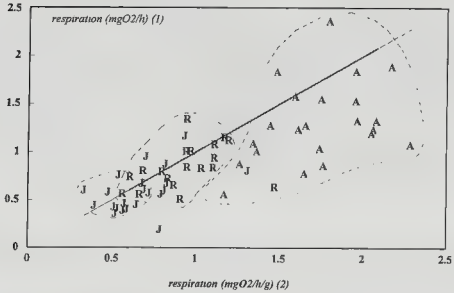



Figure 7. Oyster experimental respiration results (1), fitted to the respiration model (2). RESPI = [-0,432 + (0,613 x $1{,}042^{(TEMP)}$)] x $DMW^{0.8}$ (Bougrier et al., 1995). J=ST: starvation condition; R=DS: *Skeletonema costatum*; A=DM. mixed algal diet.

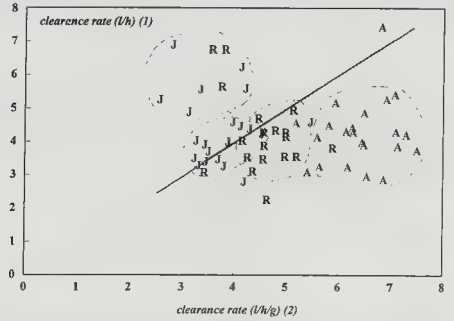



Figure 8. Oyster experimental clearance rate result (1), fitted to the clearance rate model (2): CLEAR = [4,825 - (0,013 x $(TEMP-18{,}954)^2$)] x $DMW^{0.439}$ (Bougrier et al., 1995) J=ST: starvation condition, R=DS: *Skeletonema costatum*; A=DM. mixed algal diet.

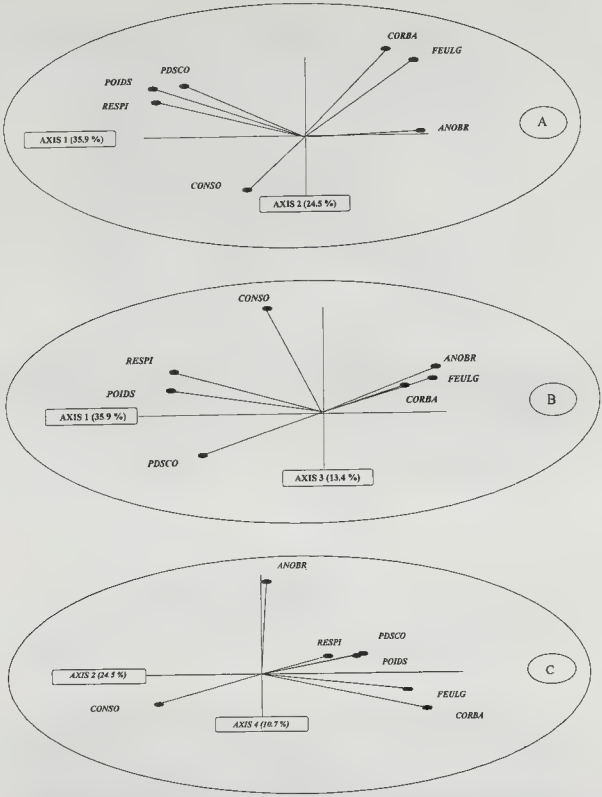



Figure 9. Correlation between descriptors and principal axes in a Principal Component Analysis (PCA) Variable contribution on 1, 2 3 and 4 axis.

Table 5. Main Physiological responses and Energetic budget based on organic matter. ST: starvation condition, DS: *Skeletonema costatum*; DM: mixed algal diet. Results are standardized to 1 g dry meat weight oyster according to Bayne and Newell (1983). (±CL): ± 0.05 confidence limits.

| Measurements | Diets ST (±CL) | DS (±CL) | DM (±CL) |
|---|---|---|---|
| clearance rate (liter $h^{-1}$) | 5.87 (±0.84) | 4.59 (±0.72) | 3.19 (±0.31) |
| consumption (mg $h^{-1}$) | 3.64 (±1.23) | 5.75 (±0.91) | 2.93 (±0.67) |
| absorption (mg $h^{-1}$) | -0.59 (±0.91) | 2.22 (±0.61) | 1.19 (±0.43) |
| absorption efficiency (%) | -0.17 (±0.35) | 0.39 (±0.09) | 0.40 (±0.10) |
| absorption (J $h^{-1}$) | -9.97 (±15.41) | 36.04 (±10.45) | 20.20 (±7.43) |
| respiration (J $h^{-1}$) | 12.60 (±2.30) | 11.43 (±2.36) | 10.36 (±1.65) |
| scope for growth (J $h^{-1}$) | -22.57 (±15.91) | 25.09 (±10.70) | 9.84 (±7.50) |

*Pathology*

Several oysters had microscopically visible gill lesions that appeared as indentations. Most of the affected oysters showed one to several indentations on one or several lamellae. When oysters were heavily infected with the *Chlamydia*-like organism using TEM's analysis, the whole lamella was affected and appeared unusually thin. No significant difference in macroscopical lesions were observed in infected individuals in the three treatments ST (66.6 %), DS (58 %) and DM (50 %) ($p > 0.05$, Chi-square test).

A Chi-squared test was performed on the histologicaly detectable abnormalities associated with rearing conditions (table 6). No significant difference was observed among treatments ST, DS and DM, for either basophilic intracytoplasmic corpuscles (BASIN), Feulgen positive inclusion bodies (FEULG), or mass hemocytic infiltration (HEMIN). In contrast, gill structure (GABNO) changes were significantly lower (12%) in oysters from treatment DM (Chi-squared =7.46) compared to the others treaments. The three treatments ST, DS and DM were significantly different at $\alpha=1\%$ when all pathological abnormalities were simultaneously considered.

Table 6. Count of the presence of gill or mantle abnormalities from the treatments: ST: starvation condition, DS: *Skeletonema costatum*; DM: mixed algal diet. Not significant: NS, significant at 5% level (*) (BASIN) basophilic cytoplasmic inclusion bodies in connective tissue of gills and mantle, (FEULG) Feulgen positive cytoplasmic inclusion bodies in connective tissue of gills and mantle; (GABNO) Drastic changes of the normal gill structure in several areas as filament fusion; (HEMIN) mass hemocytic cellular infiltration in connective tissues of several organs.

| Diets | ST | DS | DM | Chi 2 | Sig. level (1) |
|---|---|---|---|---|---|
| BASIN | 10 | 6 | 14 | 5.48 | NS |
| FEULG | 10 | 15 | 18 | 5.64 | NS |
| GABNO | 2 | 10 | 11 | 7.46 | * |
| HEMIN | 21 | 22 | 21 | 0.23 | NS |
| MACRO | 16 | 14 | 12 | 4.35 | NS |

*Multivariate Analysis*

The correlation matrix showed positive relationships among the physiological variables FECES and RESPI and condition index (CONDI) and between FECES and the consumption rate (CONSU) (table. 7). In contrast, no relationship was established between CONSU and RESPI, nor between macroscopical abnormalities (MACRO) and other variables. Several variables were highly correlated: basophilic inclusion bodies (BASIN) and Feulgen positive corpuscles (FEULG),

and Feulgen positive corpuscles and gill structure abnormalities (GABNO) detected by histology Gill structure changes observed by histological examination were not correlated with basophilic inclusion bodies. Negative relationships were observed between histological abnormalities (GABNO, BASIN and FEULG) and physiological characteristics (RESPI, CONSU and FECES), but the clearance rate (CLEAR) was positively correlated with gill structure abnormalities (GABNO).

These results prompted us to select the following variables to perform the Principal Component Analysis: BASIN, FEULG, GABNO, DMW, DSW, CONSU and RESPI (figure 9). Four axes summarized 85% of the total variance (table 8). The RESPI and DMW characterized the first axis, while BASIN and FEULG the second, CONSU the third and GABNO the fourth axis (figure 9).

Table 7. Correlation matrix (BASIN) basophilic cytoplasmic inclusion bodies in connective tissue of gills and mantle; (FEULG) Feulgen positive cytoplasmic inclusion bodies in connective tissue of gills and mantle; (GABNO) Drastic changes of the normal gill structure in several areas as filament fusion; (MACRO) gills abnormalities detected through macroscopical examination; (CONDI) condition index, (CLEAR) clearance rate; (CONSU) consumption rate; (FECES) feces production, (RESPI) respiration *Circled values indicate significant level * 0.05 level; ** : 0.01 level and *** : 0.001 level.*

| | gabno | macro | basin | feulg | condi | clear | consu | feces | respi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **gabno** | | 0.03 | 0.15 | (0.31) | -0.24 | (0.29) | -0.09 | -0.11 | (-0.27) |
| **macro** | NS | | -0.12 | -0.12 | -0.18 | 0.11 | 0.02 | -0.05 | 0.10 |
| **basin** | NS | NS | | (0.68) | -0.01 | 0.03 | (-0.29) | -0.16 | -0.07 |
| **feulg** | ** | NS | *** | | -0.13 | 0.06 | -0.24 | (-0.29) | -0.21 |
| **condi** | NS | NS | NS | NS | | -0.03 | 0.14 | (0.37) | (0.67) |
| **clear** | * | NS | NS | NS | NS | | (0.40) | 0.22 | 0.00 |
| **consu** | NS | NS | * | NS | NS | ** | | (0.66) | 0.17 |
| **feces** | NS | NS | NS | * | ** | NS | *** | | (0.36) |
| **respi** | * | NS | NS | NS | *** | NS | NS | ** | |

Table 8 Eigenvalues and percentage of variance explained by the principal axes of PCA

| Axis | Eigenvalues | % | cumulative |
|---|---|---|---|
| 1 | 2.53 | 36.1 | 36.1 |
| 2 | 1.72 | 24.5 | 60.6 |
| 3 | 0.98 | 14.1 | 74.7 |
| 4 | 0.72 | 10.3 | 85.0 |
| 5 | 0.53 | 7.7 | 92.7 |
| 6 | 0.26 | 3.7 | 96.4 |
| 7 | 0.25 | 3 6 | 100.0 |

## DISCUSSION

Condition index ranged from 1.5 to 5.5 during a rearing cycle for *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (Bodoy *et al.*, 1986). In this experiment, oysters from the starved treatment ST reached a 2.74 value, well above the minimum value encountered in natural conditions. The condition index for ST group was 3.15 when the experimentation started. Therefore, while seawater temperature increased from 14.5°C to 21°C, the condition index of ST oyster group was not significantly affected by starvation. However, the complete starvation did not occur since bacteria and total particulate matter (1.0-1.7 mg $l^{-1}$), circulating through the biological filter, represented available food for the oysters.

The 12.4% lipid content estimated in DM treatment oysters characterized a mature stage (Deslous-Paoli and Héral, 1980). Moreover, the glycogen storage percentage for group DS animals typifies the stage of the maturation process (Gabbott, 1975). With regards to protein content, all the estimates are below those from wild oyster populations in spite of similar analytical methods being used. Although the protein content usually increases between February and May, we reported an abnormal 10% loss in treatment DS. This pattern is likely to represent stress resulting from the *Chlamydia*-like infection. Differences in carbohydrate and glycogen content, depressed in the DM group, probably resulted from the gonadal maturation process.

The allometric coefficient for oyster respiration was used for our experimental populations since consumption depends mainly on the individual whole weight (Bayne et Newell, 1983) (i.e. gonadal and somatic tissues). Therefore, a weight increase due to reproductive effort is likely to result in respiration increase. In contrast, the clearance rate' allometric coefficient is inappropriate during reproductive growth, since it depends mainly on gill surface area. Therefore, the use of this allometric coefficient is unlikely suitable to estimate clearance rate during the maturation process.

Clearance and food consumption rates are therefore probably underestimated for the treatment DM and to a lesser extent for treatment DS, resulting in underestimated scope for growth. This effect of the maturation process on allometric coefficients has been pointed out by Bayne et Newell (1983), Ansell (1973) and Emerson *et al.*, (1988) respectively on *Mytilus edulis*, *Donax vittatus* and *Mya arenaria*.

Moreover, the methodology developed for the "instantaneous" scope for growth measurement may have mainly affected the sexually mature oysters (group DM) than the other treatments. By way of example, allometric coefficients to standardize the respiration results are significantly different between ripe or immature oysters. The poor fittings of the curve between the biomass production and the scope for growth was unexpected for treatment DM after one month on an improved food quality.

While several authors discuss the energy balance and allocation during the maturation process, little evidence is available on the feeding behavior during the spawning period. Newell and Thompson (1984) reported a reduced clearance rate for *Mytilus edulis* between 5 to 10 days during the spawning period. Also, *Crassostrea virginica* sperm is likely to include an hormone-analogue which expands the ostia of the gills to a size range greater than the gametes and to reduce retention rate during spawning (Nelson and Allison 1940, in Newell and Thompson, 1984).

Although not a complete starvation, the ST treatment resulted in negative scope for growth. Those oysters were significantly more affected by the *Chlamydia*-like microorganism than where otherwise treated. A Chi squared test performed on all pathological criteria (BASIN, FEULG, GABNO and HEMIN) was significant at 5 % level value. The oyster fed with algae (DS and DM) had a positive scope for growth. The DS oysters fed with *Skeletonema* sp initiated the maturation process. The condition DM, oysters fed with mixed algae had already reached sexual maturity when physiological functions were estimated. The reduced scope for growth in treatment DM does not reflect biomass production (P), which were results significantly higher for this group compared to the others groups. This difference can be explained by biological feeding behavior associated

with gonadal maturation stage and/or, by some bias resulting from inappropriate allometric coefficient used for physiological computations.

The production (P) as defined by Winberg (1960), and the scope for growth (SFG) (Warren and Davis, 1967) are two representations of the same concept. The SFG reflects the instantaneous bivalve capacity to use quality and quantity of food, evaluated in energetic terms, under controlled conditions. Therefore, it represents the potential growth. In contrast, the biomass production integrates the whole environmental variability over the beginning and the experiments completion representing the effective growth. For monitoring networks using bioindicators, such as the 'Mussel Watch' in the USA, or the 'RNO' in France, both approaches have been considered. Gilfillan and Vandermeulen (1978), Bayne and Worall (1980), Thompson and Mac Donald (1991) reported no significant differences between scope for growth under laboratory experimental conditions and natural production. Moreover, Bayne *et al.*, (1985) reached similar conclusions when physiological measurements were carried out within 24 hours after bivalve sampling (Widdows, 1985).

In this study, the scope for growth was measured using a standard water with the algae *Tetraselmis suecica* (10000 cel $ml^{-1}$). The SFG was 10 J $h^{-1}$ $g^{-1}$ and 25 J $h^{-1}$ $g^{-1}$ for treatment DM and DS respectively. Although absorption rates were almost similar between the two groups, oysters from the DM treatment had a lower clearance and consumption rates than those from DS treatment. Actually, the total production including somatic and gonadic tissues, and shell organic matrix was estimated to 0, 10.1, and 45.8 J $h^{-1}$ $g^{-1}$, respectively at the end of the experiment. These results differ considerably from SFG results: - 22.6, 25.1 and 9.8 J $h^{-1}$ $g^{-1}$ for the conditions ST, DS and DM respectively.

Several criteria may be considered as stress indicators. Barber *et al.*, (1988), Newell (1985) and Newell and Barber (1988) have shown that clearance rate, oxygen consumption or condition indices were appropriate bioindicators for assessing effects of the pathogen *Haplosporidium nelsoni* on the physiological condition of the Eastern oyster *C. virginica* . Our results confirm this approach assessing pathogen effects. One group of oysters, with damaged gills, was well identified when fitted to the model as showing 'abnormal' clearance rate behavior (figure 8).

Photonic and electronic histological examinations showed abnormalities linked to the occurrence of the *Chlamydia*-like organism in all three treatments (ST, DS and DM). The basophilic cytoplasmic inclusion bodies detected by using Hemalum-Eosin stains are considered to be *Chlamydia*-like organisms.

Among the four abnormalities detected by photonic histology, gill structure changes seemed to be treatment dependent. Oysters from treatment ST appeared to be more heavily infected with *Chlamydia*-like organisms than those from the others treatments. No significant difference in prevalence was observed among oysters from treatment DM and DS. Based on these results, it would be interesting to test the *Chlamydia*-like infection trend on a greater experimental time. These abnormalities in a large number of oysters among the three treatments did not facilitate discriminating these various treatments.

In our study, a significant relationship between gross and histological examinations was not established. In several cases, macroscopic lesions were not associated with histological abnormalities. This might be explained by technical constraints since only one 3 µm section was observed per oyster. On the other hand, cases in which microscopic examinations revealed tissue abnormalities without the presence of macroscopic lesions may represent an early stage of infection.

The significant relationship between the occurence of basophilic inclusion bodies and the presence of Feulgen positive corpuscles suggest that both types of abnormalities are similar and dependent upon the stain used (i.e., Hematoxylin and Eosin, Feulgen and Rossenbeck nucleal reaction). This evidence confirms results from Renault *et al.*, (1994). The basophilic inclusion bodies also positively stained with Feulgen is stain and indicate the presence of DNA within inclusions.

The positive correlation between Feulgen positive inclusion bodies (FEULG) and gill structure lesions (GABNO) detected by histology demonstrated that microorganisms might induce tissue

degradation However, the occurrence of basophilic corpuscles (BASIN) was not correlated to gill structure changes (GABNO). Several hypotheses could be proposed:

- Nucleal reaction of Feulgen and Rosenbeck might be more sensitive than the Hematoxylin and Eosin stain for *Chlamydia*-like infection detection. Moreover, gill structure changes might be easier to detect than basophilic inclusion bodies occurrence.

- Feulgen positive corpuscles might be cellular fragments containing post-necrosis DNA and therefore, associated with drastic changes of tissue structure at histological level.

One of the main objectives of this study was to examine whether a relationship exists between physiological activities and pathological conditions. With regards to pathology results, the weakness of the starved oysters (ST) was well demonstrated The positive correlation between the Feulgen reaction and the presence of basophilic inclusion confirmed the presence of microorganisms in gill and mantle connective tissues.

Incorporating absorption rate or scope for growth variables into the correlation matrix, did not improve the relationships between physiology (e.g respiration, clearance) and pathogenicity. Also, no correlation was established between macroscopical observations and physiological functions.

Several negative correlations (at 5% significance level) were associated most of the pathological and physiological criteria. In contrast, the clearance rate was positively correlated to histological gills abnormalities Comparison of measurements and clearance model estimates confirmed theses results. Therefore, *Chlamydia* like infections can be detected through clearance rate measurements on oysters affected by gill abnormalities. We suggest that in order to sustain their standard metabolism, these infected oysters compensate for the deficit in functional gill surface by increased clearance activity.

In marine molluscs, various intracellular prokaryotes have been described in many species. Several authors have linked infection to abnormal mortality Buchanan (1978) in *Tellina tenuis*; Comps and Raimbault (1978) in *Donax trunculus*; Elston (1986) in *Siliqua patula*; Gulka *et al* ,(1983) in *Placopecten magellanicus* and Legall *et al* , (1988) in *Pecten maximus*. However, a direct link between microorganism and abnormal mortality has not yet been identified, excepted in the case of a rickettsia infection on the common scallop, *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991). In this case, a physiological study pointed out the energetic loss due to the rickettsia infection that affected the overall energy balance.

Our study demonstrates that simple physiological measurements, like clearance rate, can detect gill malfunction. The bioindicator role through a simple physiological function assessment is critical to detect stress or pathogens in oysters. Although no relationship was established between mortality and pathogen occurrence. Our experiment demonstrated that diet composition affected infection level, and therefore migh be critical in terms of overall shellfish management, when carrying capacity is limited by biomass overstocking (case of the cultures in Marennes-Oléron Bay). Oyster condition has been significantly affected due to overstocking since introduction of the Pacific oyster into this Bay during the 1970s (Grizel and Héral, 1991). Therefore, our study provides insight for improving shellfish management so as to maximize food availability and thus, limit pathogen effects on the oyster population. In the near future, pathogen culture should allow experimental infection to assess quantitatively the pathogen impact on oysters.

## REFERENCES


Ansell A.D., 1973 Oxygen consumption of the bivalve *Donax vittatus* (Da Costa) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **11**: 311-328.

Barber B J., Ford S. E & Haskin H H., 1988. Effects of the parasite MSX *Haplosporidium nelsoni* on oyster *Crassostrea virginica* energy metabolism I Condition index and relative fecundity *Journal of Shellfish Research*, **7**: 25-31.

Barillé L., Prou J., Héral M & Bougrier S., 1993 No influence of food quality, but ration-dependant retention efficiencies in the japanese oyster *Crassostrea gigas* *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **171**: 91-106.

Bayne B L & Worall C M., 1980. Growth and production of mussels *Mytilus edulis* from two populations *Marine Ecology Progress Series*, **3**. 317-328.

Bayne B L & Newell R C., 1983 Physiological energetics of marine molluscs *In* The Mollusca, vol 4, part 1 (Wilbur K.M. & Saleuddin A.S., Eds.): 407-513. Academic Press London.

Bayne B L., Brown D A., Burns K., Dixon D R., Ivanovici A., Livingstone D R., Lowe D M., Moore M N., Stebbing A R D. & Widdows J., 1985 The effect of stress and pollution on marine animals Praeger Publishing Company, 384 p.

Bligh E G & Dyer W F., 1959 A rapid method of total lipid extraction and purification *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**: 911-917.

Bodoy A., Prou J & Berthomé J P., 1986 Etude comparative de différents indices de condition chez l huître creuse *Crassostrea gigas*. *Haliotis*, **15**. 173-182.

Bougrier S., Geairon P., Deslous-Paoli J M., Bacher C & Jonquières G., 1995 Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **134**: 143-154

Buchanan J S., 1978 Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with the phage in the digestive gland of the marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (Da Costa) *Journal of Fish Disease*, **1**: 27-43

Comps M. & Raimbault R., 1979 Infection rickettsienne de la glande digestive de *Donax trunculus* L. Science Pêche, *Bulletin de l'Institut des Pêches maritimes*, 281

Dame R F., 1972 The ecological energies of growth, respiration and assimilation in the intertidal American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, **17**: 243-250.

Deslous-Paoli J M & Héral M., 1980 Valeur calorique de la chair de l huître *Crassostrea gigas* Thunberg estimation directe et biochimique. *Cons. Inter Exp. Mer*, Note C.N. /K.11.

Deslous-Paoli J M., Larnou A M., Geairon P., Bougrier S., Raillard O & Heral M., 1992 Effect of feeding behaviour of *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) on biosedimentation of natural particulate matter *Hydrobiologia*, **231**: 85-91.

Dubois M., Gilles K A., Hamilton J K., Rebers P A & Smith F., 1956 Colorimetric method for determination of sugars & related substances *Analytical Chemistry*, **28**(3): 350-356.

Elston R A., 1986 An intranuclear pathogen (nuclear inclusion X (NIX) associated with massive mortalities on the Pacific razor clam *Siliqua patula*. *Journal of Invertebrate Pathology* **47**: 93-104

Emerson C W., Minchinton T E & Grant J., 1988 Population stucture, biomass and respiration of *Mya arenaria* L.on temperate sandflat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **115**: 99-111

Gabbott P A., 1975 Storage cycle in marine molluscs a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis *In* Proceedings of the 9 th European marine biology symposium. (Barnes H., Ed.). Aberdeen University Press.

Gilfillan E S & Vandermeulen J H., 1978. Alteration in growth and physiology in chronically oiled soft-shell clams, *Mya arenaria*, chronically oiled with Bunker C from Chedabucto Bay, Nova Scotia, 1970-76 *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35: 630-636.

Grizel H. & Héral M., 1991 Introduction into France of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. ICES *Journal of Marine Science*, **47**: 399-403.

Gulka G., Chang P W & Marty K A., 1983. Prokaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus* *Journal of Fish Disease*, **6**: 355-364.

Heral M & Deslous Paoli J M., 1983 Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesures calorimétriques et par dosages biochimiques. *Oceanologica Acta*, **6**(2): 193-199.

Le Gall G., Chagot D., Mialhe E & Grizel H., 1988. Branchial Rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallops *Pecten maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **4**: 229-232.

Le Gall G., 1991 Contribution à l'étude de la rickettsiose de la coquille saint jacques *Pecten maximus* (Mollusca bivalvia). Thèse de doctorat de 3ème cycle. Université Paris VI. 150 pp.

Le Gall G., Mialhe E., Chagot D & Grizel H., 1991 Epizootiological study of rickettsiosis of the Saint Jacques scallop *Pecten maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **10**: 139-145.

Lowry O H., Rosebrough N., Farr A L & Randall R J., 1951 Protein measurement with the Folin phenol regent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275

Marsh, J B & Weinstein, D B., 1966. Simple charring method for determination of apids *Journal of Lipid Research*, 7 574-576

Newell R.I.E., 1985. Physiological effect of the MSX parasite (*Haplosporidium nelsoni*) on the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Shellfish Research*, **5**: 91-95.

Newell R I E. & Thompson R.J., 1984. Reduced clearance rate associated with spawning in the mussel, *Mytilus edulis* (L.) (Bivalvia, Mytilidae). *Marine Biology Letters*, **5**: 21-33.

Newell R I E. & Barber B J., 1988. A physiological approach to the study of bivalve molluscan diseases *American Fisheries Society Special Publication*, **18**: 268-280

Razet D., Héral M., Prou J., Legrand J. & Sornin J M , 1990. Variation des productions saisonnières de biodépôts (fèces et pseudofèces) de l'huître *Crassostrea gigas* dans un estuaire macrotidal : baie de Marennes Oléron. *Haliotis*, **10**: 143-161.

Renault T., Le Deuff R.M., Cochennec N & Maffart P. 1994. Herpesvirus associated with mortalities among the Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France. Comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **145**(10). 735-742.

Romberger H. P. & Epifanio C E., 1981. Comparative effects of diets consisting of one or two algal species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, **25**: 77-87.

Schwartz D., 1963. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion médecine sciences. 318 p.

Soletchnik P., Goulletquer P., Geairon P. & Razet D., 1996. Seuil de production de pseudo-fèces de l'huître creuse du Pacifique: *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans des conditions de faibles charges particulaires *Haliotis*, **25**: 13-24.

Thompson R.J., & Mac Donald B.A , 1991 Physiologie integrations and energy partitioning. *In:* Scallops. Biology, Ecology and Aquaculture (S.E. Shumway, ed ), Elsevier, Amsterdam/Oxford/New York, pp 347-377

Walne & Mann, 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *In* Proceedings of the 9 th. European marine biology symposium. (Barnes H., Ed.). 387-607 Aberdeen University Press. Scotland.

Warren G. E & Davis G.E., 1967. Laboratory studies on the feeding, bioenergetic and growth of fish. *In*. The biological basis of freshwater fish production (S.D. Gerking, ed ), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 175-214.

Whyte J. N. C., 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, **60**, 231-241.

Widdows J., 1985. Physiological response to pollution. *Marine Pollution Bulletin*, **16**(4): 129-134.

Winberg G G., 1960. Rate of metabolism and food requirements of fishes. *Translation series, Fisheries Board of Canada*, **194**: 1-253.

# Action de l'érythromycine et de l'acide oxolinique sur le développement larvaire de la coquille St Jacques *Pecten maximus*

*René ROBERT* [1], *Jean-Louis NICOLAS* [1] *et Rony CONNAN* [1]

RÉSUMÉ

En absence d'antibiotique, les élevages larvaires de coquilles St Jacques sont sujets à de fortes mortalités A l'écloserie expérimentale de mollusques d'Argenton (Bretagne, France), la présence d'un vibrio, *Vibrio pectinicida*, associé aux élevages semble être responsable de ce faible taux de survie. Les méthodes prophylactiques étant difficiles à mettre en œuvre dans les installations actuelles (stérilisation de l'eau, décontamination des œufs, isolement des élevages) seul l'ajout de chloramphénicol permet de protéger les élevages Cependant l'utilisation de cet antibiotique, considéré comme dangereux pour l'homme, est prohibée dans toute production animale, depuis 1994, en Europe. L'action de deux autres antibiotiques, l'érythromycine et l'acide oxolinique, a donc été recherchée sur les larves de *Pecten maximus*. Un suivi des élevages larvaires (croissance et mortalité) ainsi que le dénombrement des populations bactériennes (hétérotrophes et vibrios) ont été effectués en parallèle. Les bactéries majoritaires ont été isolées, caractérisées sommairement et leur résistance à différents antibiotiques vérifiée par antibiogrammes. Les résultats obtenus ont confirmé l'efficacité du chloramphénicol mais sont peu convaincants avec l'érythromycine et l'acide oxolinique En effet, une souche résistante, qui pourrait être responsable des faibles croissances observées, a été sélectionnée en présence d'érythromycine, et l'acide oxolinique s'est avéré toxique pour les larves aux concentrations testées.

ABSTRACT

**Effects of erythromycin and oxolinic acid on *Pecten maximus* larval development.**

Without antibiotics, high mortalities are regularly recorded in *Pecten maximus* larval rearing In the experimental molluscs hatchery of Argenton (Brittany, France), this phenomenon may be associated to a vibrio contamination (*Vibrio pectinicida*). The prophylactic methods are difficult to apply in routine in the present installations (seawater sterilization, isolation of larval batches, egg and algal decontaminations) and chloramphenicol is used accordingly However, this antibiotic is dangerous for human health and has been banned since 1994 in Europe The effects of other antibiotics, erythromycin and oxolinic acid, have been investigated. Growth and mortality of the great scallop larvae, exposed at different concentrations of antibiotics, as well as bacterial developments, have been studied. The dominant heterotrophic bacteria have been isolated, characterized and their resistance to different antibiograms controlled. The results confirmed the efficiency of chloramphenicol and, in the second hand, showed the toxicity of acid oxolinic while the use of erythromycin led to resistant strains Consequently, these two antibiotics are inadequate for *Pecten maximus* larval rearing.

[1] Institut Français pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire Physiologie des Invertébrés Marins, Ecloserie d'Argenton, Le Vivier, F-29840 Porspoder, France. Tel : 02 98 89 92 56 - 02 98 89 93 44. Fax : 02 98 89 93 04 — e-mail : <rrobert.ifremer.fr>

## INTRODUCTION

En écloserie de mollusques, les mortalités larvaires sont souvent associées à des proliférations bactériennes favorisées par les conditions d'élevage: température élevée, nourriture abondante, et forte densité larvaire. Deux types d'infestation sont notées. La première correspond à un envahissement de l'eau d'élevage par des bactéries hétérotrophes qui présentent un réel danger pour l'élevage lorsque leur densité dépasse $10^7$. $ml^{-1}$ (Lucas, 1980). La deuxième est due à un développement spécifique de bactéries pathogènes appartenant soit aux genres *Pseudomonas* (Brown, 1974 et 1981 a) et *Alteromonas* (Garland *et al.*, 1983), soit surtout au genre *Vibrio* (Tubiash *et al.*, 1965 ; Leibovitz, 1978 ; DiSalvo *et al.*, 1978 ; Elston et Leibovitz, 1980 ; Elston *et al.*, 1982 ; Jeffries, 1982 ; Austin *et al*, 1988). Pour les éviter, le traitement de l'eau des élevages est incontournable et consiste, le plus souvent, en une filtration fine de l'eau de mer s'accompagnant d'un renouvellement fréquent. Ces précautions sont généralement suffisantes pour la conduite d'élevage larvaire de nombreux bivalves dont les Ostréidés et les Vénéridés. Cependant, chez la plupart des Pectinidés l'utilisation d'antibiotiques s'avère nécessaire (Bourne *et al.*, 1989 , Robert *et al* , 1994). En ce qui concerne la coquille St Jacques *Pecten maximus*, l'adjonction de chloramphénicol a été jusqu'à présent appliquée de façon routinière, tant en écloserie expérimentale qu'en écloserie de production (Cochard et Gérard, 1987). Cet antibiotique a été retenu suite aux travaux de Le Pennec et Prieur (1972) et de Le Pennec *et al.* (1973) sur les larves de moules *Mytilus edulis* et son mode d'action dans le contexte de l'écloserie d'Argenton est maintenant connu (Jeanthon *et al.*, 1988 ; MICROMER, 1990).

Or, la législation européenne a interdit depuis peu l'utilisation du chloramphénicol dans le cadre des productions animales (Varma, 1994) et, de ce fait, l'amélioration zootechnique des procédures d'élevage et/ou la recherche de produits de substitution s'avèrent nécessaire. A ce jour, ni l'abaissement de densité larvaire, ni l'augmentation du renouvellement d'eau d'élevage, ni l'adjonction de substances électives n'ont permis d'améliorer les performances d'élevage (Robert *et al.*, 1996), un vibrio spécifique ayant été récemment identifié (Nicolas *et al.*, 1996). Les méthodes prophylactiques étant difficiles à mettre en œuvre dans les installations actuelles (stérilisation de l'eau, décontamination des œufs, isolement des élevages), l'action de l'érythromycine (Le Pennec et Prieur, 1972) et celle de l'acide oxolinique (Pouliquen *et al*, 1994) ont été recherchées sur le développement larvaire de la coquille St Jacques.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

Après incubation, les larves D ont été réparties en bécher de 2 l à la densité de 10. $ml^{-1}$. L'eau de mer, filtrée à 1 µm, était maintenue à 18° C, la salinité à 34 ‰ et les véligères alimentées quotidiennement en phytoplancton à raison de 30 000 cellules. $ml^{-1}$ d'eau de mer. Les élevages étaient conduits en duplicata avec de l'érythromycine ou de l'acide oxolinique aux teneurs de 1, 2, 4 et 8 mg. $l^{-1}$ et trois références étaient utilisées: avec chloramphénicol aux teneurs de 1 et 8 mg. $l^{-1}$ et sans antibiotique (témoin). La mortalité était déterminée par observation des larves au projecteur de profil tandis que la croissance était acquise en analyse d'images (Pontual, 1994).

Les bactéries hétérotrophes étaient dénombrées, par lecture directe sur milieu de Zobell et les vibrionacés sur TCBS, deux fois par semaine dans les élevages larvaires soumis aux concentrations extrêmes d'antibiotiques, 1 et 8 mg. $l^{-1}$. De plus, au 16ème jour, les colonies caractéristiques et prédominantes sur le milieu de Zobell ont été prélevées, isolées par la méthode des quadrants, puis caractérisées sur microplaques stériles en présence de différents milieux sélectifs de croissance. Les développements bactériens étaient contrôlés en spectrophotométrie par lecture de la densité optique après une semaine d'incubation. La sensibilité de ces bactéries était alors vérifiée sur antibiogramme afin de rechercher d'éventuelle résistance et de définir les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

## RÉSULTATS

Seuls seront exposés les résultats acquis à 1 et 8 mg. $l^{-1}$, les données obtenues à 2 et 4 mg $l^{-1}$ correspondant à une situation intermédiaire du point de vue mortalité et croissance larvaire quel que soit l'antibiotique concerné. Au bout de trois semaines, 50 à 90 % de mortalité sont observées chez les témoins (sans antibiotique) et chez les élevages traités à l'acide oxolinique (Fig. 1a). Ceux recevant

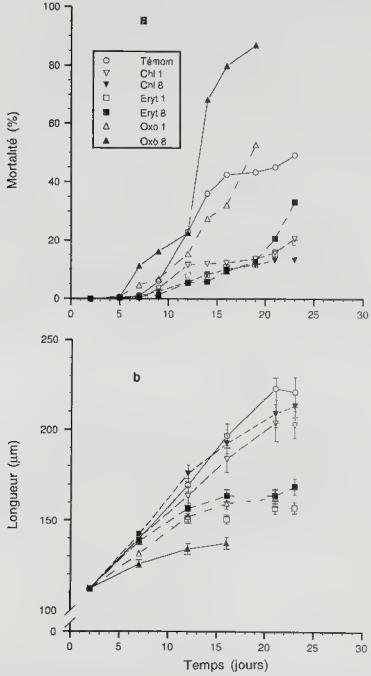



Figure 1. Mortalité (a) et croissance larvaire (b) de *Pecten maximus* exposée ou non (témoin) à des doses croissantes d'antibiotiques Chl Chloramphenicol, Eryt: Erythromycine, Oxo Acide oxolinique. 1: 1 mg $l^{-1}$, 8 8 mg $l^{-1}$.

de l'érythromycine ou du chloramphénicol ne subissent que 15 à 30 % de perte Des croissances satisfaisantes sont observées chez le témoin et chez les larves traitées au chloramphénicol, avec des taux journaliers de croissance compris entre 4,30 et 5,20 µm (Fig. 1b). A l'inverse, un faible développement est noté en présence d'acide oxolinique et d'érythromycine avec des taux d'accroissement compris entre 1,80 à 3,00 µm par jour.

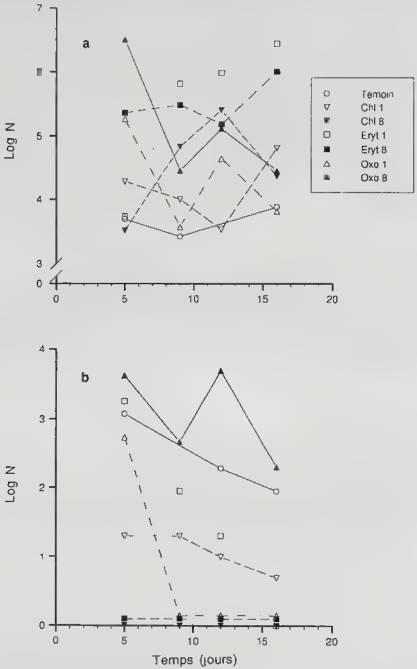



Figure 2 Evolution du nombre de bactéries hétérotrophes (a) et des vibrionacés (b) exprimé en Unité Formant Colonie (UFC) Les bactéries ont été isolées d'élevage larvaire de *Pecten maximus* exposé à des doses croissantes d'antibiotiques ou non (témoin), puis mises en culture sur milieux de Zobell et TCBS.
Chl: Chloramphénicol ; Eryt: Erythromycine ; Oxo: Acide oxolinique. 1: 1 mg. $l^{-1}$ ; 8: 8 mg. $l^{-1}$.

Chez les témoins et dans les élevages traités au chloramphénicol, $10^4$ à $10^6$ de bactéries hétérotrophes (UFC. ml $^{-1}$) sont dénombrées (Fig 2a), valeurs voisines de celles classiquement rencontrées dans nos conditions de culture. En ce qui concerne les témoins, les vibrionacés varient entre $10^2$ et $10^3$ UFC. ml$^{-1}$, alors que ceux-ci ne s'expriment quasiment pas en présence de chloramphénicol (Fig 2b). Dans les élevages ayant reçu de l'érythromycine, le nombre de bactéries hétérotrophes augmente lorsque la concentration en antibiotique diminue, les populations atteignant ainsi $10^6$ UFC. ml$^{-1}$ (Fig. 2a) Quant aux vibrios, ils diminuent constamment au cours du temps à la teneur de 1 mg. l$^{-1}$, aucune bactérie de ce genre n'étant détectee à 8 mg l$^{-1}$. Le nombre de bactéries hétérotrophes, se développant dans les élevages traités avec de l'acide oxolinique, diminuent avec le temps mais, varie en sens inverse avec la concentration (Fig. 2a). De même, les vibrios sont plus abondants à la teneur de 8 mg. l$^{-1}$ avec des concentrations comprises entre $10^3$ et $10^4$ UFC ml$^{-1}$ (Fig 2b).

Les colonies bactériennes majoritaires se développant chez les témoins et dans les élevages traités au chloramphénicol ont le même aspect rondes, de taille moyenne, a contour net, jaunâtre, brillantes et bombées. Celles dénombrées dans les élevages traités à l'érythromycine présentent un aspect similaire mais sont blanches, tandis que celles se développant à partir des élevages traités à l'acide oxolinique sont de grosse taille, plates et de couleur crème. La caractérisation des bactéries par étude de leur croissance en milieu sélectif confirme ces premieres observations: les bactéries présentes dans les lots non traités aux antibiotiques se comportent de façon tres voisines à celles du chloramphénicol 1 et 8 mg. l$^{-1}$ (Tableau 1) Leur réponse aux antibiogrammes montre la forte similitude entre ces colonies exception faite de la sensibilité au chloramphénicol des colonies bactériennes présentes dans les lots non traités aux antibiotiques (Tableau 2) De même, malgré quelques divergences concernant leur développement en milieu non salé (0 ‰ de NaCl), en présence de D gluconate et de D glucuronate, les colonies isolées a partir des elevages traités a l'érythromycine 1 et 8 mg l$^{-1}$ présentent des caractères et des antibiogrammes similaires Une forte sensibilité à l'acide oxolinique et a la kanamycine est ainsi relevée (Tableaux 1 et 2) Par contre, les colonies "acide oxolinique" 1 et 8 mg. l$^{-1}$ sont similaires en ce qui concerne leurs caractères (Tableau 1) et leur sensibilité aux différents antibiotiques mais, des ecarts importants de CMI, en particulier avec la streptomycine et la kanamycine, sont enregistrés (Tableau 2).

## DISCUSSION ET CONCLUSION

L'effet protecteur du chloramphénicol même à faible concentration (1 mg l$^{-1}$) est à nouveau démontré dans le présent travail et renforce ainsi les recommandations émises antérieurement (Robert *et al*, 1996) Néanmoins, cet antibiotique n'inhibe pas totalement les developpements bactériens. Une colonie hétérotrophe résistante non pathogene, présentant une forte similitude avec celle se développant dans les élevages temoins, a pu être isolée Néanmoins, même si les teneurs actives ont été fortement abaissées, ce résultat ne permet pas résoudre le probleme pose puisque cet antibiotique est dorénavant interdit en production animale Bien qu'exerçant une action favorable sur la survie larvaire l'érythromycine n'est pas adapté, sous la thérapie actuelle, pour *Pecten maximus*. En effet, au cours de ces expérimentations, une colonie résistante, probablement responsable des faibles croissances larvaires, a été identifiée Ces résultats renforcent nos premieres observations qui mettaient en avant une protection aléatoire des élevages avec cet antibiotique (Robert *et al.*, 1996). Son efficacité semble reposer essentiellement sur la composition initiale de la microflore de l'eau de mer. Néanmoins, compte tenu de la forte sensibilité de la colonie résistante à la kanamycine et à l'acide oxolinique, son association avec ces deux autres molécules pourrait être envisagée. Aux concentrations utilisées, l'acide oxolinique s'est averé toxique pour les larves y compris sous forme d'oxolinate de sodium Cependant, cet antibiotique est très efficace sur la plupart des bactéries isolées (CMI très faibles). De meilleurs developpements larvaires étant obtenus a la teneur de 1 mg l$^{-1}$, une bonne protection pourrait exister à de moindres teneurs Il serait donc intéressant de vérifier son efficacité ainsi que celle du florphénicol dérivé du chloramphénicol mais non toxique (Varma, 1994). La démarche expérimentale retenue ces dernières années à l'écloserie d'Argenton était basée sur l'hypothèse d'une forte sensibilité des larves de *Pecten maximus* à une

Tableau 1 : Caractérisation des bactéries isolées à partir des élevages larvaires témoins ou traités aux différents antibiotiques (chloramphénicol, érythromycine, acide oxolinique). Les valeurs correspondent aux croissances bactériennes en spectrophotométrie selon l'échelle suivante - pour DO < 0,1, 1+ pour 0,1< DO < 0,3; 2+ pour 0,3 < DO < 0,7 et 3+ pour DO > 0,7.

| | Témoin | Chloram-phénicol (1 mg/l) | Chloram-phénicol (8 mg/l) | Erythro-mycine (1 mg/l) | Erythro-mycine (8 mg/l) | Acide oxolinique (1 mg/l) | Acide oxolinique (8 mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zobell | 2+ | 2+ | - | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| Oxydase | + | + | - | + | + | + | + |
| NO3 | - | - | - | - | - | - | - |
| Indole | - | - | - | - | - | - | - |
| Tween 80 | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | 1+ | 2+ | 2+ |
| Tween 20 | 2+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 2+ | 2+ |
| Gélatinase | + | + | + | + | + | + | + |
| NaCl 0% | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | - | 3+ | 3+ |
| NaCl 3% | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ |
| NaCl 6% | 2+ | 3+ | 2+ | 3+ | 2+ | 3+ | 3+ |
| NaCl 8% | 2+ | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 3+ | 3+ |
| NaCl 10% | 3+ | 2+ | 3+ | 2+ | 3+ | 3+ | 3+ |
| Tyrosine | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | - |
| Galactose | 2+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ |
| Inositol | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | - | 1+ | 1+ |
| Glycérol | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | - | - | - |
| Mélibiose | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ |
| Succinate | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ |
| Arabinose | - | - | - | - | - | - | - |
| Sucrose | + | + | + | + | + | + | + |
| Mannose | - | - | - | - | - | - | - |
| L-alanine | 2+ | 1+ | - | 2+ | 2+ | 2+ | 1+ |
| B-alanine | 2+ | 1+ | - | 2+ | 1+ | 1+ | 1+ |
| L-arginine | 2+ | 1+ | - | - | 1+ | 1+ | 1+ |
| Caséine | 2+ | 1+ | - | - | - | 1+ | - |
| Citrate | - | - | - | - | - | - | - |
| D-cellobiose | - | - | - | - | - | 1+ | - |
| Ethanol | 1+ | 1+ | - | - | - | 1+ | - |
| D-gluconate | 2+ | 2+ | - | 2+ | - | 1+ | 1+ |
| D-glucose | 2+ | 1+ | - | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ |
| D-glucuronate | 2+ | 1+ | - | 2+ | - | 2+ | 1+ |
| Glycine | 2+ | 1+ | - | 1+ | - | 1+ | 1+ |
| L-histidine | 1+ | 1+ | - | - | - | 1+ | - |
| L-leucine | - | 1+ | - | - | - | - | - |
| D-mannitol | - | - | - | - | - | - | - |
| L-ornithine | - | - | - | 1+ | - | - | - |
| Propionate | 2+ | 2+ | - | 2+ | 2+ | 1+ | 1+ |
| Pyruvate | 2+ | 2+ | - | 2+ | 1+ | 2+ | 1+ |
| Saccharose | 2+ | 1+ | - | 2+ | 1+ | 1+ | 1+ |
| D-sorbitol | 2+ | 2+ | - | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ |

Tableau 2 : Sensibilité à six antibiotiques des bactéries prédominantes isolées des élevages larvaires témoins ou traités (au chloramphénicol, à l'érythromycine et à l'acide oxolinique).

| | | Témoin | Chloram-phénicol (1 mg/l) | Chloram-phénicol (8 mg/l) | Erythro-mycine (1 mg/l) | Erythro-mycine (8 mg/l) | Acide oxolinique (1 mg/l) | Acide oxolinique (8 mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Chloram-phénicol | DI (mm) | 30 | 0 | 0 | 6 | 9 | 15 | 0 |
| | CMI (mg/l) | 2 | | | 52 | 46 | 34 | |
| | Sensibilité | S | R | R | R | R | R | R |
| Erythro-mycine | DI (mm) | 31 | 13 | 26 | 0 | 0 | 28 | 32 |
| | CMI (mg/l) | 0,25 | 16 | 0,25 | | | 0,25 | 0,25 |
| | Sensibilité | S | I | S | R | R | S | S |
| Acide oxolinique | DI (mm) | 32 | 20 | 15 | 29 | 31 | 28 | 18 |
| | CMI (mg/l) | 0,5 | 2 | 9 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 4 |
| | Sensibilité | S | I/S | I | S | S | S | I |
| Strepto-mycine | DI (mm) | 13 | 13 | 13 | 12 | 11 | 11 | 16 |
| | CMI (mg/l) | 16 | 16 | 16 | 20 | 26 | 26 | 0,5 |
| | Sensibilité | I | I | I | I | I | I | S |
| Kana-mycine | DI (mm) | 21 | 11 | 17 | 20 | 21 | 19 | 18 |
| | CMI (mg/l) | 0,5 | 26 | 8 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 12,8 |
| | Sensibilité | S | I | I/S | S | S | S | I |
| Pénicilline | DI (mm) | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | CMI (mg/l) | | 0,5 | | | | | |
| | Sensibilité | R | S | R | R | R | R | R |

DI (mm): diamètre inhibition
CMI (mg/l): concentration minimale inhibitrice

R: bactérie résistante
S: bactérie sensible
I: bactérie de sensibilité intermédiaire

pression bactérienne générale (Robert *et al.*, 1995) puisqu'aucun vibrio n'avait été décelé jusqu'à présent (raisons techniques). La cause de ces mortalités étant dorénavant identifiée (Nicolas *et al*, 1996) la source de contamination doit être préalablement étudiée pour permettre l'application de mesures prophylactiques adaptées. En effet, ces vibrios peuvent être présents soit dans l'eau de mer extérieure, soit dans nos cultures d'algues (stocks ou volumes de production), soit dans les géniteurs (Elston, 1990). Si ceux-ci sont détectés dans les cultures d'algues (volume de production) et en eau extérieure, un traitement complémentaire de l'eau de mer aux ultra violets et au charbon actif doit être envisagé, l'action bénéfique de ces techniques ayant été rapportée antérieurement (Brown, 1981 b). Si leur présence est décelée dans les stocks d'algues et/ou dans les géniteurs un traitement par antibiotique peut être envisagé. L'efficacité de l'acide oxolinique et/ou du florphénicol pourrait ainsi être vérifiée. Cependant la modération de l'emploi des antibiotiques sera privilégiée lors de ces prochaines études. En particulier le traitement de l'eau des élevages par adjonction d'antibiotique est à proscrire car des doses massives et aveugles créent d'insolubles problèmes (Lucas et Prieur, 1974) surtout si les eaux d'élevage ne subissent aucun traitement préalable avant rejet. Cette pratique est probablement à l'origine d'une partie des problèmes actuellement rencontrés par certaines écloseries chiliennes de pétoncle *Argopecten purpuratus*.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Austin B , Bucke D., Feist S.W & Helm M.M., 1988 Disease problems among cultured bivalve larvae Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, Internal Report N°16 22 pp

Bourne N., Hodgson C.A. & Whyte J.N.C., 1989. A manual for scallop culture in British Columbia *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, **1694:** 215 pp.

Brown C., 1974. A pigment-producing pseudomonad which discolors culture containers of embryos of a bivalve mollusk. *Chesapeake Science*, **15**. 17-21.

Brown C., 1981 a. A prodiginine pigment toxic to embryos and larvae of *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **38**: 281-293.

Brown C., 1981 b. A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. *Journal of Shellfish Research*, **1**(1): 83-87.

Cochard J.C. & Gérard A., 1987. Production artificielle de naissain de coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.) en rade de Brest: analyse des facteurs affectant la croissance larvaire. 6th International Pectinid Workshop, Menai Bridge, Wales, 9-14 April 1987, 13 pp (mimeo)

Di Salvo L.H., Blecka J. & Zebal R., 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Applied environmental Microbiology*, **35**(1): 219-221.

Elston R., 1990. *Mollusc diseases guide for the shellfish farmer*. Washington University Press, 73 p

Elston R. & Leibovitz L., 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, **37**(6): 964-978.

Elston R., Elliot E.L. & Colwell R.R., 1982. Conchiolin infection and surface coating *Vibrio* shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Fish Diseases*, **5**: 265-284.

Garland C.D., Nash G.V., Sumner C.E. & McMeekin T.A., 1983. Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. *Australian Journal of Marine Freshwater Research*, **34**. 483-487

Jeanthon C., Prieur D. & Cochard J.C., 1988. Bacteriological survey of antibiotic treated seawaters in a *Pecten maximus* hatchery. Aquaculture, **71**: 1-8.

Jeffries V.E., 1982. Three vibrios strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **29**: 201-226.

Le Pennec M. & Prieur D., 1972. Développement larvaire de *Mytilus edulis* (L.) en presence d'antibiotiques. 1ère partie: détermination des concentrations actives non toxiques de quatre antibiotiques. Aureomycine, Erythromycine, Chloramphénicol et Sulfamérazine. *Revue Internationale d'Océanographie Medicale*, **28**: 167-179.

Le Pennec M., Prieur D. & Chardi P., 1973. Développement larvaire de *Mytilus edulis* (L.) en présence d'antibiotiques. 2ème partie: action sur la croissance de quatre antibiotiques: Aureomycine, Erythromycine, Chloramphénicol et Sulfamérazine. *Revue Internationale d'Océanographie Medicale*, **30**. 115-137

Leibovitz L., 1978. Shellfish diseases. *Marine Fishery Review*, **40**: 61-64.

Lucas A., 1980. Problème de génétique, d'écophysiologie et de pathologie dans les écloseries de bivalves. *Océanis*, **5**. 1-23.

Lucas A. & Prieur D., 1974. Le contrôle bactérien des élevages de larves de bivalves. *In* Actes de Colloques sur l'Aquaculture, 1, CNEXO ed.: 11-23.

MICROMER, 1990. Étude des peuplements bactériens au cours d'un cycle d'elevage de 48 h de larves de *Pecten maximus*. Rapport IFREMER N°892522185: 12 pp.

Nicolas J.L., Corre S., Gauthier G., Robert R. & Ansquer D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Diseases of Aquatic Organisms*, **27**: 67-76.

Pontual H., 1994. Système de biométrie larvaire de bivalves par analyses d'images. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Brest. Rapport DRV9423: 43 pp

Pouliquen H., Pinault L. & Le Bris H., 1994. Determination of oxolinic acid in sea water, marine sediment and Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, **17**(4): 929-945

Robert R., Miner P., Mazuret M. & Connan J.P., 1994. L'écloserie experimentale d'Argenton. Bilan et perspective. *Équinoxe*, **49**: 20-33.

Robert R., Miner P., Nicolas J. L., Mazuret M. & Connan J.P., 1995. Etude sur les mortalités larvaires de la coquille St Jacques *Pecten maximus* en écloserie. RIDRV 95-15 RA/Brest: 51pp.

Robert R., Nicolas J.L. & Miner P., 1996. Mortality control of scallop (*Pecten maximus*) larvae in the hatchery. *Aquaculture International*, **4**: 305-313

Tubiash H.S., Chanley P.E. & Leifson E., 1965. Bacillaris necrosis a disease of larval and juvenile bivalve molluscs. I. Etiology and epizootiology. *Journal of Bacteriology*, **90**: 1036-1044

Varma K.J., 1994. Phenicoles (florphenicol, thiamphenicol and chloramphenicol). Proceedings of "Antibiotics in Animal Intensive Production" European Symposium, 25-27 Octobre 1994, Ploufragan, France: 63-65

# Nutritional inadequacy of *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris* for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae

*René ROBERT* [1]


## ABSTRACT

The evaluation of *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris* as nutrient sources for oyster larvae has been attempted in the present work. After a study of their growth and size distributions, these two species were used as food for *Crassostrea gigas* larvae. Despite proper sizes (2.5 to 20 $\mu m^3$) the larval development of *Crassostrea gigas* was poor. Evaluation of ingestion and digestion of both algae, by means of epifluorescence microscopy, on 2 day and 6 day old larvae showed that they were normally ingested but weakly digested. Consequently, their nutritional inadequacy for larval molluscs may be also related to their indigestibility.

## RÉSUMÉ

**Qualité nutritionnelle inadéquate de *Nannochloris atomus* et *Stichoccocus bacillaris* pour les larves de *Crassostrea gigas*.**

L'évaluation de *Nannochloris atomus* et de *Stichoccocus bacillaris* comme algue fourrage pour des larves d'huîtres a été réalisée au cours du présent travail. Après une étude en milieu contrôlé de la croissance et de la distribution en taille de ces algues, ces deux espèces de phytoplancton ont servi d'aliment à des larves d'huître *Crassostrea gigas*. Malgré la petite taille du nanoplancton (2,5 à 20 $\mu m^3$) le développement larvaire de l'huître est médiocre. L'étude de leur assimilation et dégradation en microscopie à épifluorescence montre que ces algues sont bien ingérées mais peu digérées par des larves de 2 et 6 jours. Leur pauvre valeur alimentaire peut donc être également reliée à leur faible digestibilité.


## INTRODUCTION

Despite recent progress in artificial diets (Nell and O'Connor, 1991 ; Robinson, 1992 ; Southgate *et al.*, 1992 ; Laing and Millican, 1992 ; Laing and Lopez Alvarado, 1994 ; Coutteau *et al.*, 1994 ; Robert *et al.*, 1996 ; Nell *et al.*, 1996), phytoplankton is still today the only available food for rearing molluscs. The suitability of a phytoplankton species employed as an algal diet may be characterized by its size, mobility, digestibility and biochemical composition. Moreover, to be commonly used in a hatchery-nursery, the mass culture of microalgae must be easy, fast growing and

[1] Institut Français pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire Physiologie des Invertébrés Marins, Ecloserie d'Argenton, Le Vivier, F-29840 Porspoder, France. Tel : 02 98 89 92 56 - 02 98 89 93 44. Fax : 02 98 89 93 04 — e-mail : <rrobert.ifremer.fr>.

reliable (Robert and Trintignac, 1997) Few nanoplankton organisms fit these criteria (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1986 , Coutteau and Sorgeloos, 1992) and in order to increase this number. several unicellular marine algae have been isolated from an oyster spatting area, the Bay of Arcachon (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1991). The food value of two of them, *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris*, as single species, for the larvae of *Crassostrea gigas* is reported in the present work.

## MATERIALS AND METHODS

The growth and size distributions of *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris*, grown in batch culture in 5 liter flasks, were studied, for 6 weeks by means of a Coulter counter ZB ZBi connected to a channelyser C1000, following the techniques previously described (Robert and His, 1987) These two chlorophyceae were isolated from the Bay of Arcachon, and their identification previously made (Chretiennot *et al.*, 1991). Their effects on growth rate and survival of *Crassostrea gigas* larvae were investigated following the techniques reported by Robert *et al.* (1989). Moreover, ingestion and digestion rates of these unicellular algae by *Crassostrea gigas* larvae were compared to those of *Isochrysis galbana* (control strain originated from Conway, Chretiennot *et al* , 1991) Epifluorescence microscopy was used to detect uptake and lysis of each phytoplankton species on 2 day and 6 old larvae fed on a single diet according to Babinchack and Ukeles (1979).

## RESULTS

From Day 1 to Day 13 the concentration of *Nannochloris atomus* varied from $1.4 \times 10^7$ cell. $ml^{-1}$ to $16.4 \times 10^7$ cell. $ml^{-1}$ with a daily division rate of 0.298 (Fig. 1) Optimum cell density was noted on Day 28 with $2.3 \times 10^8$ cell. $ml^{-1}$ The culture did not collapse at the end of the experiment, on Day 48 and thus the stationary phase lasted at least 5 weeks. From Day 2 to Day 12 the concentration of *Stichoccocus bacillaris* varied from $1.16 \times 10^7$ cell. $ml^{-1}$ to $7.3 \times 10^7$ cell. $ml^{-1}$ with a daily division rate of 0.265 (Fig 1). Optimum cell density was observed on Day 39 with $1.17 \times 10^8$ cell. $ml^{-1}$. The experiment ended on the 46th day with no collapse of the culture.

Similar size frequency distribution of *Nannochloris atomus* was recorded until the 25th day of culture with an average cell volume of 4.5 $\mu m^3$ (≈ 2 µm equivalent diameter) Then a slight increase in cell volume was noted. Similar size frequency distribution of *Stichoccocus bacillaris* was recorded during the exponential phase of growth with an average cell volume of 6 $\mu m^3$ (≈ 2.30 µm equivalent diameter) Nevertheless, during the stationary phase, its cell volume increased gradually to reach an average cell volume of 14 $\mu m^3$ (≈ 3.00 µm equivalent diameter)

No growth occurred when young *Crassostrea gigas* larvae were fed for 8 days with *Nannochloris atomus* or *Stichoccocus bacillaris* (Fig. 2) In contrast, the control fed with *Isochrysis galbana* grew well (Fig. 2) and exhibited a daily width increment of 5.91 µm. High mortalities (≥ 80 %) were recorded at the end of the experiments, on Day 11, when larvae were fed with these chlorophyceae while only 5 % were observed in the controls.

Two hours after feeding, the ingestion of *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris* by 2 day old *Crassostrea gigas* larvae was equivalent to that of *Isochrysis galbana* (Table 1). However, 24 h later, no digestion of *Nannochloris atomus* occurred and, compared to the control, a delay in that process was equally noted with *Stichoccocus bacillaris* (Table 1) On the other hand, the uptake and beginning of lysis of *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris* by 6 day old *Crassostrea gigas* larvae were noted 3 h after feeding. In contrast, during the same period, those fed with *Isochrysis galbana* exhibited effective digestion. A greater delay was noted 24h later when complete digestion was only observed with *Isochrysis galbana* (Table 2).

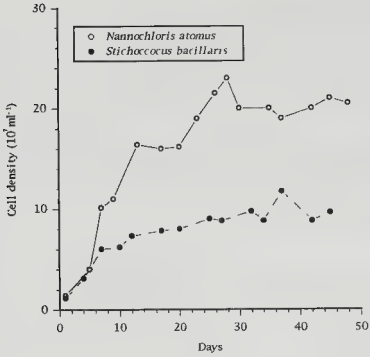



Figure 1. Growth of *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris* in batch culture (5 l flasks).

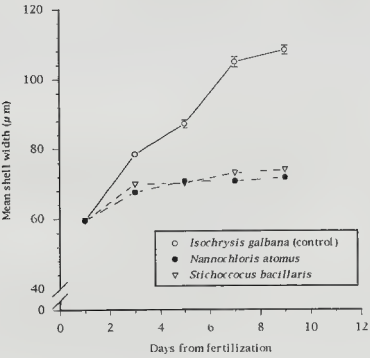



Figure 2. Growth of *Crassostrea gigas* larvae fed with *Isochrysis galbana* (control), *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris*.

Table 1. Rates of ingestion and digestion of *Nannochloris atomus*, *Stichoccocus bacillaris* and *Isochrysis galbana* (control) by 2 day old *Crassostrea gigas* larvae.

| Sampling (hours) | *Nannochloris atomus* | | | | *Stichoccocus bacillaris* | | | | *Isochrysis galbana* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | % of larvae observed at each feeding stage | | | | % of larvae observed at each feeding stage | | | | % of larvae observed at each feeding stage | | | |
| | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 |
| 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 97 | 3 | 0 | 0 |
| 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 95 | 5 | 0 | 0 | 0 | 40 | 60 | 0 |
| 24 | 100 | 0 | 0 | 0 | 2 | 38 | 60 | 0 | 0 | 5 | 75 | 20 |

Stage 1 : Ingestion; Stage 2 . Beginning of digestion ; Stage 3 : Digestion; Stage 4 : Complete digestion.

Table 2. Rates of ingestion and digestion of *Nannochloris atomus*, *Stichoccocus bacillaris* and *Isochrysis galbana* (control) by 6 day old *Crassostrea gigas* larvae.

| Sampling (hours) | *Nannochloris atomus* | | | | *Stichoccocus bacillaris* | | | | *Isochrysis galbana* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | % of larvae observed at each feeding stage | | | | % of larvae observed at each feeding stage | | | | % of larvae observed at each feeding stage | | | |
| | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 |
| 3 | 56 | 44 | 0 | 0 | 20 | 78 | 2 | 0 | 10 | 70 | 20 | 0 |
| 6 | 42 | 46 | 8 | 4 | 0 | 90 | 6 | 4 | 0 | 16 | 74 | 10 |
| 24 | 23 | 70 | 5 | 2 | 0 | 80 | 10 | 10 | 0 | 0 | 40 | 60 |

## DISCUSSION

It is widely accepted that phytoplankton constitutes the principal food of bivalve larvae but not all phytoplankton species are equally suitable. Firstly, the good food value of some algae is related to their cell size. Concerning the upper size limit, algal cells have to be less than the larval gut diameter and most of the algal species used in mollusc hatchery are less than 15 µm accordingly (Robert and Trintignac, 1997). Concerning the lower size limit the ability to ingest cells less than 2 µm was shown to be weak until recently (for reviews see Bayne, 1983, Strathmann, 1987). Nevertheless on natural seston *Crassostrea virginica* larvae are able to consume lower size food particles (0.2-0.8 µm: Baldwin and Newell, 1991). Moreover, when fed on cultured algal mixtures (size range:1 to 11 µm) small larvae (< 150 µm) preferred 1 µm algae while large larvae preferred 11 µm algae (Baldwin, 1995). *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris* are in the average range of 1 to 3 µm and have therefore the appropriate size to be well ingested by young *Crassostrea gigas* larvae. Epifluorescence microscopic observations, used in the present study, confirmed this assumption, both chlorophyceae being ingested at an equivalent rate than *Isochrysis galbana*, known to be highly consumed by mollusc larvae.

Secondly, to be commonly used in a hatchery-nursery, the mass culture of microalgae must be easy, fast growing and reliable (Robert and Trintignac, 1997). Despite high cell densities (from 60 to 100. million. $ml^{-1}$) at the end of the first week, the growth of *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris* was moderate. Indeed, their division rates, 0.265 and 0.298 were relatively low compared to other phytoplankton species grown in similar conditions (Robert and His, 1987). In contrast, both species did not collapse after 1.5 months of culture. This hardiness is noteworthy and may explain the excellent adaptability of *Nannochloris* sp. to open air conditions (Witt *et al.*, 1981).

Thirdly, to allow the transfert of nutrients to the larvae the algae must be well digested. In young larvae, no digestion of *Nannochloris atomus* occurred 24 h after feeding and a delay was

noted with *Stichoccocus bacillaris*. Similar trends were also observed in older larvae. When fed 24 h before with *Isochrysis galbana*, the whole larval population had digested this algae while few larvae were digesting the chlorophyceae in the meantime. Similar results have been reported with *Chlorella autotrophica* on *Crassostrea virginica* (Babinchack and Ukeles, 1979) and with *Stichoccocus* sp on *Artemia* (Gibor, 1956). Because both chlorophyceae are weakly digested by young *Crasssostrea gigas* veligers, no larval growth occurred. Such absence of growth was also observed on *Tapes philippinarum* and *Pecten maximus* larvae fed, respectively as single species, with fresh *Nannochloris atomus* (Laing *et al*, 1990) and fresh *Chlorella minutissima* (Robert *et al.*, 1996).

Moreover, when fed *Nannochloris atomus*, growth was also poor in *Mercenaria mercenaria* spat while reasonably good development of *Ostrea edulis* juveniles was obtained at high ratio (500 cells.µl $^{-1}$: Walne, 1970). However, the latter author reported that *O. edulis* spat growth was only equal to the half of the *Isochrysis* control.

In contrast, Laing *et al.* (1990) have shown that the equivalent of *Nannochloris atomus* as dried algae allowed larval development. This result suggests that drying process may induced a fragility of the cell wall making the diet more easily digested.

Lastly, several authors have reported a lack or low levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in these chlorophyceae (Dunstan *et al.*, 1992 ; Jeffrey *et al.*, 1994). PUFA are well-known to be essential compounds in the growth of marine molluscs (Brown *et al.*, 1989) and the biochemical composition of *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris* may also explain their poor quality for *Crassostrea gigas* larval development.

## CONCLUSION

Despite proper sizes and hardiness of the phytoplankton cultures, neither *Nannochloris atomus* nor *Stichoccocus bacillaris* are good food organisms for *Crassostrea gigas* larvae. This inadequacy may be related to their weak digestibility, shown especially on young veligers, linked to their inadequate biochemical compositon. Similar results have been reported on *Chlorella* and therefore, it may be confirmed that chlorophyceae are unsuitable, as single diets, for mollusc larval rearing.

## REFERENCES


Babinchack J. & Ukeles R., 1979. Epifluorescence microscopy, a technique for the study of feeding in *Crassostrea virginica* veliger larvae. *Marine Biology*, **51:** 69-76

Baldwin B S , 1995 Selective particle ingestion by oyster larvae (*Crassostrea virginica*) feeding on natural seston and cultured algae. *Marine Biology*, **123:** 95-107.

Baldwin B S & Newell R I E , 1991. Omnivorous feeding by planktotrophic larvae of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, **78:** 285-301.

Bayne B.L., 1983. The physiological ecology of marine molluscan larvae *In*. Verdonk N H , van den Biggelaar J A M , Tompa A. (eds). The Mollusca. Vol III. Development Academic Press, New York · 229-343

Brown M R , Jeffrey S.W & Garland C D , 1989 Nutritional aspects of microalgae used in mariculture ; a literature review. *CSIRO Marine Laboratory Report*, **205:** 44 pp.

Chrétiennot-Dinet M.J , Robert R & Ha E , 1986. Utilisation des algues-fourrage en aquaculture. *Année Biologique* **25:** 97-119

Chrétiennot-Dinet M.J , Vaulot D., Gallois R , Spano A.M & Robert R , 1991. Analysis of larval oyster grazing by flow cytometry. *Journal of Shellfish Research*, **10(2):** 457-463.

Coutteau P & Sorgeloos P., 1992 The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs An international survey *Journal of Shellfish Research*, **11**(2): 467-476.

Coutteau P , Caers M , Mallet A., Moore W., Manzi J & Sorgeloos P., 1994 Effect of lipid supplementation on growth, survival and fatty acid composition of bivalve larvae (*Ostrea edulis* L. and *Mercenaria mercenaria* L.). *In*: Measures for success. Proceedings of Bordeaux Aquaculture'94, March 23-25 1994, France, (P. Kestemont, J Muir, F. Sevilla and P. Williot, Eds.)· 213-218. CEMAGREF.

Dunstan G.A., Volkman J K., Jeffrey S W & Barret S M , 1992 Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae 2 Lipid classes and fatty acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **161:** 115-134

Gibor A., 1956. Some ecological relationships between phyto-and zooplankton. *Biological Bulletin*, **111:** 230-234

Jeffrey S.W., Brown M R & Garland C D , 1994. Microalgae for mariculture. Final Report to the Fisheries Research and Development Corporation. Combined Report on "Bacteria free (axenic) microalgae for improved production of larval and juvenile bivalves" (FIRTA Grant 86/81) and "Microalgae for mariculture" (FIRDC Grant 90/63). CSIRO and University of Tasmania report: 79 pp

Laing I , Child A.R & Janke A., 1990. Nutritional value of dried algae diets for larvae of Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Journal of marine biology Association of United Kingdom*, **70:** 1-12.

Laing I. & Millican P.F , 1992. Indoor nursery cultivation of juveniles bivalve molluscs using diets of dried algae. *Aquaculture*, 102: 231-243

Laing I & Lopez Alvarado J., 1994. Effect of dried algae diets on conditioning and fecundity of Manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve) *Aquaculture and Fisheries Management*, **25:** 157-166.

Nell J.A. & O'Connor W.A., 1991. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, larvae. *Aquaculture*, **99:** 277-284.

Nell J.A., Diemar J.A. & Heasman M. P., 1996. Food value of live yeasts and dry yeast-based diets fed to Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* spat. *Aquaculture*, **145:** 235-243

Robert R & Trintignac P , 1997. Microalgues et nutrition larvaire en ecloserie de mollusques. *Haliotis*, **26**, 1-13.

Robert R , Moal J., Miner P , Quéré C , Connan J P , Daniel J Y , Le Coz J R , Samain J.F & Mazuret M., 1996 *In*. Microalgae biomass from photobioreactors as food for fish and shellfish larvae (MANTA) European Community Program, Final report, AIR1-CT92-0286, 68-91.

Robert R., Noël T. & Gallois R., 1989 The food value of five unicellular diatoms to the larvae *Crassostrea gigas* Thunberg. *European Aquaculture Society, Special Publication*, **10:** 215-216.

Robert R. & Hie E., 1987 Croissance et spectre de six algues en cultures non renouvelées, utilisées pour la nutrition de larves de bivalves en écloserie *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes*, **49**(3-4): 165-173.

Robinson A., 1992. Dietary supplements for reproductive conditioning *Crassostrea gigas Kumamoto* (Thunberg) I Effects of gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis *Journal of Shellfish Research*, **11:** 437-441.

Southgate P.C., Lee P.S & Lucas J S , 1992 Development of artificial diets for bivalve larvae *In* Proc Aquaculture Nutriton Workshop, Salamander Bay, Australia, April 1991 (G L. Allan, W Dall eds.). 156-162.

Strathmann R. R , 1987 Larval feeding *In* Reproduction of marine invertebrates Vol IX General aspects seeking unity in diversity (Giese A C , Pearse G S , Pearse V B , eds ). 465 550 Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, California.

Walne P.R., 1970 Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus Fishery Investigations*, **2** (26). 1-61

Witt U., Koske P H , Kuhlman D , Lenz J & Nellen W , 1981 Production of *Nannochloris* spec (Chlorophyceae) in large-scale outdoor tanks and its use as a food organism in marine aquaculture *Aquaculture*, **23:** 171-181

# *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae): preliminary findings on the ecology and ethology of populations living along river banks

*Christiane VAREILLE-MOREL* [1], *Daniel RONDELAUD* [2] *and Gilles DREYFUSS* [3]

RÉSUMÉ

***Galba truncatula* Müller (Gastéropodes, Lymnaeidae): premières données écologiques et éthologiques sur les populations qui vivent sur les berges de rivière.**

Des observations malacologiques ont été réalisees pendant deux années sur deux populations de *Galba truncatula* vivant sur des berges de rivière, lors de l'étiage des cours d eau (juin-septembre). Les deux colonies choisies sont celles de Saint-Gaultier (Indre) en bordure de la rivière la Creuse et celle de Saint-Victurnien (Haute-Vienne) en bordure de la rivière la Vienne L'effectif de chaque colonie passe par un maximum au début d'août et chute ensuite jusqu'à la ré immersion des habitats Des pontes ont été notées dans ces habitats en juillet et au début d août Ces arguments appuient l'hypothèse d une seule génération annuelle dans ces colonies de rivière Les distances horizontales et verticales des mollusques émergés par rapport au niveau de l'eau sont importantes à la mi-juillet (jusqu à 1,2 m pour les premières, jusqu à 20 cm pour la seconde) et redeviennent plus faibles lors des relevés ultérieurs (de 2 à 5 cm) Des mollusques en immobilité permanente, avec le corps rétracté dans la coquille, ont été observés dans les deux stations et leur nombre s'accroît avec la date du relevé. De ces études, il ressort que les berges de rivière ne constituent pas un milieu des plus favorables pour le développement des Limnées tronquées.

ABSTRACT

Malacological observations were carried out over 2 years, during the low-water period (from June to September) in two *Galba truncatula* populations, living along river banks. The first population lived at Saint-Gaultier (department of Indre) along the river Creuse, whereas the second colony lived at Saint-Victurnien (department of Haute-Vienne) along the river Vienne. In each population the snail number was maximum at the onset of August and decreased afterwards until habitat inundating Egg-deposits were noted in these habitats in July and at the onset of August. These facts support the hypothesis of a single annual generation of *G truncatula* in these populations living on river banks The greatest horizontal and vertical distances between the emerged snails and water-level were noted at the mid July (until 1 2 m for the former distances, until 20 cm for the latter), they decreased afterwards until 2-5 cm. Permanently-fixed snails, having their body withdrawn into the shell, were noted in the two stations and their number increased in time. From these studies, it can be concluded that these river banks did not constitute favorable habitats for the development of *G. truncatula* populations.

[1] Faculté des Sciences, Laboratoire de Malacologie Appliquée, 123, avenue Albert Thomas, F-87060 Limoges.

[2] Faculté de Médecine, Laboratoire d'Histopathologie Parasitaire, 2, rue du Docteur-Raymond-Marcland, F-87025 Limoges (corresponding author)

[3] Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Parasitologie, 2, rue du Docteur-Raymond-Marcland, F-87025 Limoges.

## INTRODUCTION

Fasciolosis is a frequent parasitosis in wet countries and especially affects cattle or sheep. The life cycle of *Fasciola hepatica* Linné, 1758 necessitates an intermediate host (freshwater snails) in which multiplication of larval forms occurs. In western Europe, this snail is an amphibious species: *Galba truncatula* Muller, 1774. The number of annual generations of the snail permits to deduce that of parasitic cycles and, subsequently, the periods of cercarial shedding (Taylor, 1965). Some authors (Walton and Jones, 1926, Roberts, 1950; Heppleston, 1972; Smith, 1981) have already reported the existence of a 2-generation pattern for *G. truncatula* in swampy meadows, however, during wet years with a mild winter, the snail might give another spring generation which was intercalated between the 2 former generations.

The problem was more complex when the populations of *G. truncatula* lived in different habitats. Rondelaud and Mage (1992), de Massias *et al.* (1996) found a single annual generation for *G truncatula* when altitude increased. The number of snail generations was still unknown in populations living along river banks. In a previous work, Lacourarie (1996), Dreyfuss *et al.* (1997) demonstrated the presence of lymnaeid populations in the mean part of rivers, with low numbers of snails, however, their study was difficult, for snail habitats were submersed more than 8 months over year. Ecological investigations may so be performed only during emergence of habitat from water, i.e. from June to August or September.

In view of these preliminary findings, the following questions arose: how many generations can *G. truncatula* have during the lowest water-level of rivers ? Did snails remain in the same place in their habitats or did they follow water retirement ? What was the percentage of snails which survived after this water retirement by the use of shell fixation on a support ? To answer these 3 questions, field investigations were performed over 2 successive years, from June to September to study the ecology and ethology of these snail populations.

## MATERIALS AND METHODS

The first habitat of *G. truncatula* ran along the river Creuse and was located in a small island, called Ilon, commune of Saint-Gaultier, department of Indre, France. It was situated at the bottom of a hydro-electric station and was lying on calcareous rocks. The area colonized by *L. truncatula* was 16 $m^2$ and stretched from the station wall to an old main sewer. Periodic variations of water level in the canal originating from the hydro-electric station were noted in summer in relation to station working so that the habitat is partly submersed at regular intervals each day. The second habitat ran along the river Vienne and was located in the town of Saint-Victurnien, department of Haute-Vienne. It was situated below road D 32. Two-mica embrechites constituted the subsoil. Snails lived on the lowest part of a wall, on a surface of 6 $m^2$ during summer months.

Figure 1 gives water height in each river between March and October 1995. At Saint-Gaultier, the snail habitat was located from 14 to 41 cm above canal bottom and was emerged from July to mid September (Fig. 1a). At Saint-Victurnien, the snail habitat was situated from 4 to 60 cm above the river bottom in this place: it was completely emerged in July and was partly submersed in June and August (Fig. 1b).

Fortnightly investigations were carried out in each habitat over 1994 and 1995, from July to October when the habitats are emerged or partly submersed. The first parameter was measured over 1994 and concerned the density of *G truncatula* living in three 1 $m^2$ quadrants, randomly chosen into each station. Snails were counted visually, however, they were not collected. The 2 subsequent parameters were the number of egg masses per 3 $m^2$ during each investigation time and the number of eggs in each mass using a count under the stereomicroscope. The 4 last parameters were noted for 100 snails per habitat and per investigation time: i) the physiological state of snails (normal activity, permanent fixation on a support), ii) the horizontal distance between the snail (emerged, submersed) and the limit of water at Saint Gaultier, iii) the vertical distance between snail position and water-level in the two stations, and iv) shell height. Individual values recorded

for each parameter were averaged and standard deviations were established, taking into account the investigation date and station studied. One-way analysis of variance (Stat-Itcf, 1988) was used to establish levels of significance.

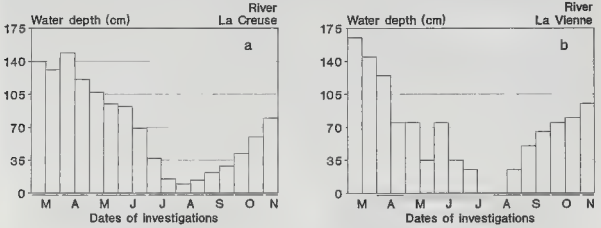



Figure 1. The water-level variations from March to October 1995 noted in the river Creuse, at Saint Gaultier, department of Indre, France (1a) and in the river Vienne, at Saint-Victurnien, department of Haute-Vienne (1b)

## RESULTS

Two snail categories were found in each station. The first of them corresponded to snails present in the emerged habitats, which laid eggs in July (EM snails). The second category comprised their descendants, which hatched from these eggs and were present in submersing habitats in July or September.

### *Density of snails and egg masses in emerged habitats*

Figure 2 shows the mean densities noted over 1994 for snails, whatever their generation, and for egg masses laid on emerged soil.

Adult snails were few in number during the emergence of habitat from water: from 11 to 17 per $m^2$ at Saint-Gaultier in June (Fig 2a), from 4 to 6 per $m^2$ at Saint-Victurnien (Fig. 2b). An increase in snail numbers was subsequently noted until the onset of August, followed by a steadily decrease of mean values. In submersing habitats, the mean densities were 21 snails/$m^2$ at Saint-Gaultier at the end of September, and 19/$m^2$ at Saint-Victurnien at the end of August. A significant difference between the number of snails in June and that found during the submersion of habitat was noted at Saint-Gaultier ($F = 7.09$, $P < 0.01$) and at Saint-Victurnien ($F = 4.46$, $P < 0.05$).

Egg masses were found in both stations in July and at the onset of August. Their density was maximum on July 19-21, with 3.2 egg masses/$m^2$ at Saint-Gaultier (Fig. 2a), 4.2 masses/$m^2$ at Saint-Victurnien (Fig. 2b). Histological examination of these egg masses under the stereomicroscope demonstrated the presence of 5.1 ± 1.3 eggs/mass at Saint-Gaultier, 4 6 ± 1 1 eggs/mass at Saint-Victurnien (data not shown).

### *Shell height*

Figure 3 gives the mean height of *G. truncatula* noted in both stations over 1995 in relation to snail category. At Saint-Gaultier (Fig. 3a), the mean size of EM snails on June 3 was 4 mm and standard deviations were high. This height did not change much until July 16 and increased until 5.4 mm at the onset of August. In contrast, the mean size of their descendants increased from 2.1 mm

on July 16 to 4.5 mm in September. In the station of Saint-Victurnien (Fig. 3b), shell height was less than 5 mm. Despite of the high values of standard deviations, the size of EM snails increased until 4 mm on July 23. The height of their descendants increased since this last date to a value of 3.1 mm during the submersion of the habitat. No significant difference between the mean heights from the 2 snail categories was noted in each station separately considered.

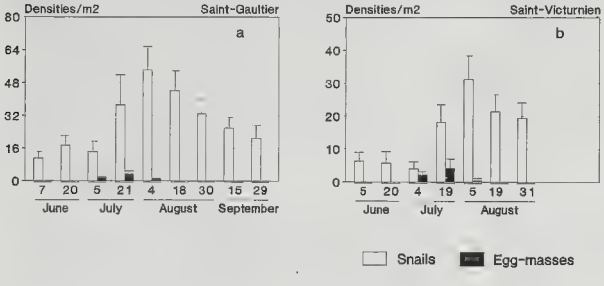



Figure 2. The density of snails and of egg deposits per $m^2$ of soil over 1994, in the sites of Saint-Gaultier (2a) and Saint-Victurnien (2b).

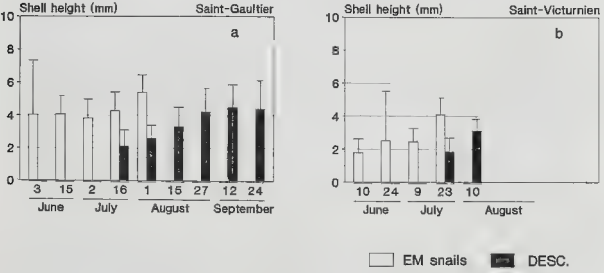



Figure 3. The shell height of snails over 1995, in the sites of Saint Gaultier (3a) and Saint-Victurnien (3b) Abbreviations: EM snails (snails present on the banks after their emergence from water), DESC (descendants)

*Position of snails in relation to water-level*

Figure 4a gives the horizontal distances that were found between emersed snails and the water-level at Saint-Gaultier over 1995. The mean distance increased from 3.7 cm on June 3 to more than 125 cm on July 16. A decrease in mean values was subsequently noted and the distance was only 2-3 cm after August 15. A significant difference between the mean values was found ($F = 132.5$, $P < 0.001$). It was interesting to note that the newborns and juvenile snails present on July 16 were at a distance of $120 \pm 51$ cm from water.

The vertical distances between snails and water-level are also given on Figure 4. At Saint-Gaultier (Fig. 4a), the mean values increased until 20 cm on July 16 and subsequently lowered until 1-2 cm after August 15. At Saint-Victurnien (Fig. 4c), there was a steadily decrease in mean values throughout investigation period: from 15 cm on June 10 to less than 4 cm on August 10. The EM snails were located to a mean distance of 15 cm and more above the water-level on June 10, whereas their descendants were found at 8 cm above the surface of water on July 23. Significant differences between mean values were noted at Saint-Gaultier ($F = 67.23$, $P < 0.001$) and at Saint-Victurnien ($F = 86.92$, $P < 0.001$).

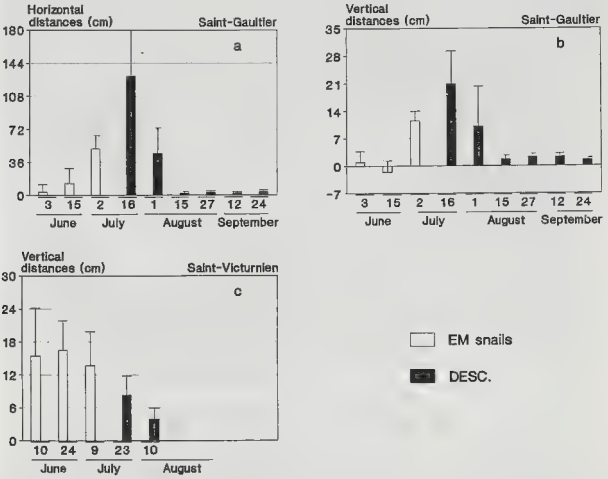



Figure 4 The horizontal distances between the emerged snails and water-level over 1995, at Saint-Gaultier (4a), and the vertical distances in the sites of Saint Gaultier (4b) and Saint Victurnien (4c). Abbreviations: EM snails (snails present on the banks after their emergence from water), DESC. (descendants).

***Permanently-fixed snails***

The body of these snails was withdrawn into the shell and the mouth of the latter was fixed on a support by dried mucus. Thus, these snails were found on more or less dry, emerged zones, and were re-activating only during the submersion of river banks.

Table 1 indicates snail numbers in relation to investigation date. At Saint-Gaultier, the percentage of these snails was less than 16% on July 16, and subsequently increased until 75% when the total numbers of *G. truncatula* decreased in the site. At Saint-Victurnien, the percentages of fixed snails were in the same range of values: from 11% to 23%. If the counting was performed over the total investigation period in each station, 11.3% and 19% of fixed snails were encountered at Saint-Gaultier and Saint-Victurnien, respectively.

Table 2 gives the results recorded between July 9 and July 16 (in 1995) in both stations The choice of these two dates corresponded to the investigations for which the highest vertical distances between snails and water-level were noted Vertical distances noted for fixed snails ranged from 20 to 35 cm at Saint-Victurnien (on July 9), and from 30 to 45 cm at Saint-Gaultier (on July 16).

All shell heights were noted for fixed snails (data not shown).

Table 1. Distribution of permanently-fixed snails over 1995, from June to September in the two stations in relation to the date of observations.

| Dates of investigation | Saint-Gaultier | | Saint-Victurnien. | |
|---|---|---|---|---|
| | Number | % | Number | % |
| June 1-14 | 5 | 5.0 | 11 | 11.0 |
| June 15-30 | 3 | 3.0 | 22 | 22.0 |
| July 1-14 | 11 | 11.0 | 21 | 21.0 |
| July 15-31 | 14 | 14.0 | 23 | 23.0 |
| August 1-14 | 9 | 9.0 | 18 | 18.0 |
| August 15-31 | 11 | 36.6 | 0 | - |
| September 1-14 | 4 | 57.1 | 0 | - |
| September 15-30 | 4 | 75.0 | 0 | - |
| Total | 61 | 11.3 | 95 | 19.0 |

Table 2. Numerical distribution of permanently-fixed snails in relation to the vertical distance between the snails and water-level

| Station | Date of investigation | Vertical distance | Number of fixed snails |
|---|---|---|---|
| Saint-Gaultier | July 16, 1995 | 30/35 cm | 7 |
| | | 36/40 cm | 5 |
| | | 40/45 cm | 2 |
| Saint-Victurnien | July 9, 1995 | 20/25 cm | 15 |
| | | 26/30 cm | 4 |
| | | 30/35 cm | 2 |

## DISCUSSION

The egg-laying period noted in July and at the onset of August for the *G. truncatula* living along river banks corresponded to that reported by de Massias *et al.* (1996) in snail habitats located in several meadows on Jura and Alps Mountains, between 800 and 2,000 m in altitude. This result supports only the hypothesis of a single annual generation in the former populations, for the investigations were performed during the lowest water-levels of rivers (3-4 months). In submersed habitats, the existence of another egg-laying period for *G truncatula* was still unknown. In our opinion, the existence of a second annual generation in submersed habitats was improbable, for water temperature rapidly dropped under 15° C from the onset of September to the subsequent month of June as it was noted by Mouthon (1980, 1981) during its studies in the rivers Doubs and Ognon in France. In more, the existence of a single annual generation, with an egg-laying period in July or August, seemed to be general for freshwater pulmonates (Russell Hunter, 1964; Duncan, 1975).

If the hypothesis of a single annual generation was considered as valid, the EM *G. truncatula* would correspond to snails of the previous year, which had overwintered in their submersed habitats and had ended their growth during the emergence of these sites from water from June. Great fluctuations in the shell height of these snails were noted during the emergence of the habitats from water (Fig. 2a, b). A similar finding was also noted for the size of their descendants when the sites were submersing by water. These two results indicated a relative disparity in snail growth in emerged habitats as well as in submersed sites. From these facts, it may be hypothesized that river banks would not be favorable habitats for species development, as Lacourarie (1996) had suggested it during their studies on the distribution of *G truncatula* colonies and snail numbers along river banks. This last hypothesis is also based on i) the small numbers of overwintering snails, that were noted during the emergence of habitats, ii) the drop in the numbers of juvenile snails after mid August, and iii) mean shell height, which did not exceed 6 mm at Saint-Gaultier and 5 mm at Saint-Victurnien.

Literature review did not show any observations on the position of emerged snails in relation to the water-level in rivers. The single works concerned the *G. truncatula* populations living in swampy meadows: according to Rondelaud and Morel-Vareille (1975), Rondelaud (1978), the snails did not follow water retirement during summer months but they took refuge under the nearest vegetation when they had time enough before soil drying. Our studies demonstrated that in both stations, juvenile snails were found at a great vertical distance from the water-level in July and at the onset of August. Two hypotheses may be proposed to explain this last result. The first of them concerned snail's egg masses. Despite water retirement, the eggs present in these masses would be able to develop and produce newborns. The main factor, which could act on this point, would be the residual humidity, which persisted in the habitat during 1 or 2 weeks after water retirement. This first assumption is partly based on the observation, at several times, of egg masses located in wet, emerged areas and containing differentiating embryos. The second hypothesis would be to admit that some juveniles followed water retirement, thus inducing a real selection in the colony, for juvenile snails were fixing permanently or died, whereas others came down to the habitat bottom. This last hypothesis might explain the high decrease noted in snail numbers when shell height increased.

The presence of permanently-fixed snails had already been reported by several authors (Mehl, 1932; Roberts, 1950; Kendall, 1954, for example) during summer drying in the populations of *G truncatula* living in swampy meadows. Two hypotheses, perhaps complementary, may be proposed to explain this finding. The first of them involved that the process might be one of the means that the species used to guard against the constraints related to flow variations on river banks. But it can also be assumed that the frequency of permanently-fixed snails might be in direct relation to snail growth, as *G truncatula* became less and less active when shell height increased. Despite this mean, numerous fixed snails died, and only survived those that were fixed in cracks or in areas with persistent humidity. The presence of permanently-fixed snails might partly explain

the variations in size noted in the juvenile snails at the end of August or in September. This hypothesis is based on the percentage of snails fixed at Saint-Gaultier in September (57% to 75%).

## REFERENCES


Dreyfuss G , Vareille-Morel C & Rondelaud D , 1997 Les habitats de *Lymnaea truncatula* Muller (Mollusque) le long de deux rivières. *Annales de Limnologie*, **33**: 67-72.

Duncan C.J., 1975. Reproduction. *In* Pulmonates Vo. 1 Functional anatomy and physiology. (V Fretter & J Peake, eds.): 309-365. Academic Press, London/New York/San Francisco.

Heppleston P.B , 1972 Life history and population fluctuations of *Lymnaea truncatula* Muller, the snail vector of fascioliasis. *Journal of Applied Ecology*, **9**: 235-248

Hunter W R , 1964. Physiological aspects of ecology in nonmarine molluscs *In*. Physiology of mollusca Vol. 1. (K M. Wilbur & C M Yonge C M eds) 83-126. Academic Press, New York/San Francisco/London

Kendall S.B , 1953 The life-history of *Limnaea truncatula* under laboratory conditions *Journal of Helminthology*, **27**: 17-28.

Lacourarie C , 1996 Étude éco-éthologique des populations de *Lymnaea truncatula* Muller vivant le long des rivières Leur infestation par *Fasciola hepatica* Linné Thesis Doct. Pharmacy, Limoges, n° 308, 118 p

Massias E. de, Rondelaud D., Mage C & Gevrey J., 1996 *Lymnaea truncatula* Muller dans les zones de haute altitude. Existence d une seule génération annuelle. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, **14**. 54-61

Mehl S., 1932. Die Lebensbedingungen der Leberegelschnecke (*Galba truncatula* Muller) Untersuchungen uber Schale, Verbreitung, Lebensgeschichte, naturliche Feinde und Bekampfungsmoglichkeiten *Arbeiten aus der Bayerischen Landesanstalt fur Pflanzenbau und Pflanzenschutz*, **2**: 1-177.

Mouthon J , 1980 Contribution à l'écologie des Mollusques des eaux courantes Esquisse biotypologique et données écologiques. Thesis Doct. Nat. Sci., Paris VI, n° 412, 169 p.

Mouthon J , 1981 Typologie des mollusques des eaux courantes Organisation biotypologique et groupements socio-écologiques *Annales de Limnologie*, **17**: 143 162

Roberts E.W , 1950 Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Limnaea* (*Galba*) *truncatula* Muller in the fields and under controlled conditions *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **44**: 187 206

Rondelaud D , 1978 Contribution à l'étude écologique et éthologique de *Lymnaea* (*Galba*) *truncatula* Muller, vecteur de *Fasciola hepatica* L Recherche de moyens de lutte biologique en Limousin Thesis Doct. Nat. Sci , Limoges, n° 4, 302 p.

Rondelaud D. & Mage C , 1992. *Lymnaea truncatula* Muller les conséquences d'une seule génération annuelle sur les caractéristiques de l'infestation par *Fasciola hepatica* L *Revue de Médecine Vétérinaire*, **143**: 843-846

Rondelaud D & Morel-Vareille C , 1975 Distribution estivale et survie des Limnées tronquées (*Lymnaea* (*Galba*) *truncatula* Muller) saines ou infestées par *Fasciola hepatica* L *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **50**. 603-616.

Smith G , 1981. A three-year study of *Lymnaea truncatula* habitats, disease foci of fascioliasis. *British Veterinary Journal*, **17** 329-342.

Stat-Itcf, 1986. Manuel d utilisation Institut Technique des Céréales et des Fourrages, Service des Etudes Statistiques, Boigneville, 210 p.

Taylor E L , 1965 Fascioliasis and the liver fluke. F A O Agricultural Studies, Rome, n° 64, 236 p

Walton C.L & Jones W.N , 1926 Further observations on the life history of *Limnaea truncatula*. *Parasitology*, **18** 144-147.

# Variabilité morphométrique de la palourde *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) le long des côtes tunisiennes

*Hatem BEN OUADA* [1], *Mohamed Nejib MEDHIOUB* [1], *Amel MEDHIOUB* [1], *Hanen JAMMOUSSI* [2] *et Mohamed BEJI* [3]

ABSTRACT

**Morphometric variability of the european clam *Ruditapes decussatus* (Linné 1758) along the Tunisian coasts**

This work is a first assessment, of levels of polymorphism of *R. decussatus* a long the coasts of Tunisia by biometric methods.

This approach is based on the appraisal of the variability according to the determination of six criteria, related to the size (length, height and thickness), to the symmetry (gap of the two extremities right and left) and to the weight of the shell, for samples harvested in 11 sites distributed from north to the south of the country.

Statistical analysis are the one factor variance analysis, the discriminate analysis and the factorial analysis for main components (ACP).

If one considers the means values of the chosen criteria or the centers of gravity and the size of clouds of points of the ACP, it is easy to distinguish the sites ones from another This distinction, is meaningful at the 5% risk level, for the two variables related to the symmetry (Fisher ratio 26.9 and 26 8) as well as for the variable bound to the length of the shell (Fisher ratio 14.2)

A more complete survey of the variability, in and between sites, shows that this distinction is only relative as there are no phenotypes definitely characteristic of a site or a given region. On the one hand all the ellipses of isodensity overlap extensively around the origin of the axes of the ACP (1,2 and 1,3) and on the other hand the ratio of inertia (in shares/ between shares) is always greater than 1 (1.7 to 4 4) for all the measured criteria.

If we consider that all the individuals have a common origin, it is possible using the classification by the method of the dynamic clouds and combining the classes and the chosen criteria, to distinguish the morphometric characteristics of three different phenotypes: globular, tapering or truncated

RÉSUMÉ

Ce travail est une première évaluation du degré du polymorphisme chez *R. decussatus* le long des côtes de la Tunisie, par les méthodes biométriques.

L'approche que nous présentons est axée sur l'estimation de la variabilité par six caractères, liés aux dimensions (longueur antéro-postérieure, hauteur et épaisseur), à la symétrie (angles de courbure droit et gauche) et au poids de la coquille, d'échantillons recoltés dans 11 sites répartis du nord au sud du pays.

[1] Institut National des Sciences et Technologie de la Mer. 5000 Monastir, Tunisie
[2] Ecole de Commerce. Tunis, Tunisie
[3] Laboratoire de Génétique. Faculté de Pharmacie. 5000 Monastir, Tunisie

Les méthodes d'analyse statistique utilisees sont l'analyse de la variance à un facteur, l analyse discriminante pas à pas et l'analyse en composantes principales (ACP).
Si l'on se base sur les moyennes des caractères ou sur les centres de gravité et les étendues des nuages de points de l ACP, il est aisé de distinguer les sites les uns des autres Cette distinction, est significative au seuil de 5%, pour les deux variables liés à la symétrie (rapports de Fisher de 26 9 et 26.8) ainsi que pour la variable longueur de la coquille (rapport de Fisher de 14.2).
L étude plus approfondie de la variabilité inter et intra sites montre cependant que cette distinction n'est que relative dans la mesure ou il n existe pas des phénotypes caractérisant, d'une manière absolue, un site ou une région donnée En effet, d'une part toutes les ellipses d'isodensité se chevauchent largement autour de l'origine des axes de l ACP (1,2 et 1,3) et d'autre part le rapport d inertie (intra lots / inter-lots) est toujours supérieur à 1 (1.7 à 4.4) et ceci pour tous les caractères étudiés
Emettant l'hypothèse que tous les individus ont une origine commune, il est possible en utilisant la classification par la méthode des nuées dynamiques et en combinant les classes et les caractères, de distinguer les caractéristiques morphométriques de trois phénotypes différents globuleux, effilé ou tronqué

## INTRODUCTION

La palourde *Ruditapes decussatus*, mollusque bivalve largement répandu en Méditerranée et en Atlantique (Parache, 1982) présente un intérêt pour la Tunisie par ses valeurs nutritive et économique

Cette richesse marine, largement répartie sur les côtes Nord et Sud de la Tunisie (Medhioub, 1993) occupe des biotopes, aussi bien lagunaires que marins, assez variés dans leurs caractéristiques hydrologiques et biotiques (Zaouali 1984 a et b)

Il se dégage des travaux réalisés sur la palourde *Ruditapes decussatus*, que cette espèce est extrêmement polymorphe, (Wilkins,1975, Gérard, 1978, Worms et Pasteur, 1982, Jarne, 1988). Selon Moraga (1984) le polymorphisme des populations méditerranéennes semble être plus marqué que celui des populations atlantiques.

Différents auteurs se sont basés sur l'étude biométrique pour évaluer des différences ou des similitudes morphologiques entre des espèces de bivalves. Ainsi Lubet (1973) et Seed (1972) ont distingué par ces méthodes les deux espèces de moules *M. edulis* et *M galloprovincialis* Vilela (1960), Arnaud et Rimbault (1963) et Perez Camacho (1980) ont comparé les variables hauteur, longueur et épaisseur de *Ruditapes decussatus* avec une espèce voisine *Tapes pullastra* et ont montré que ces variables sont constantes chez les deux espèces à l intérieur d une même population ou entre des populations de la même espèce.

L'analyse statistique de caractères morphométriques a également été employée en vue d'évaluer les différences morphologiques de diverses populations d'espèces identiques. C'est le cas des travaux de Huelvan (1985) sur *Pecten maximus* en Bretagne. Chez la palourde européenne *Ruditapes decussatus*, Gérard (1978) a analysé 11 populations de cette espèce et a conclu, à l'existence de 3 types morphologiques de coquilles. De même Fava *et al.*, (1994) ont utilisé ce type d'analyse pour évaluer les effets de l'environnement sur *R. philippinarum*

Nous avons jugé utile, d analyser statistiquement quelques caractères morphométriques de la coquille de la palourde, comme première approche pour une meilleure compréhension de l'état de la variabilité de cette espèce sur les côte tunisiennes.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les échantillons sont prélevés dans les sites suivants des régions Nord et Sud de la côte tunisienne (Figure 1). Ils sont composés de 90 individus par site, prélevés pendant la période janvier - mars 1996. Ils sont constitués d'individus, de longueur antéropostérieure allant de 23 mm à 51 mm.

- Région Sud

***Sud du Golfe de Gabès :***
Maghraoui (**Ma**) : Sud du Golfe de Gabès.
Grine (**Gr**) : Sud du Golfe de Gabès.
Chikh yahia (**Ch**): Sud-Ouest de l'île de Jerba
Ajim (**Aj**): Coté Nord du chenal d'entrée de la mer de Bou-Ghrara.
Bou-Ghrara (**Bg**) : proximité du port de Bou-Ghrara.
Karkoub (**Kb**) : extrémité sud de la mer de Bou- Ghrara.

***Nord du Golfe de Gabès:***
Hchichina (**Hc**) : En face de la ville de Hchichina.
Khneis (**Kn**) : Coté ouest de l'ilot Khneis

- Région Nord:

***Golfe de Tunis***
Lac de Tunis (**Lt**) .
Canal de Tunis (**Ct**) .

***Bizerte***
Lac de Bizerte (**Bi**) : à coté de la station conchylicole de Menzel Jmil.

Figure 1. Position des sites de prélèvement sur la côte de la Tunisie.

Les mesures effectuées sont:
- celles liées à la dimension et au poids de la coquille : Longueur antéro-postérieure (LA), Hauteur (Ha), épaisseur (Ep) et poids de la coquille (PC),
- celles liées à la symétrie de la valve gauche de la coquille : angle de courbure droit (Alpha) et angle de courbure gauche (Bêta).
Les premières sont quantifiées à l'aide d'un pied à coulisse et par pesée Les deuxièmes sont évaluées à l'aide d'un rapporteur au degré près. La variable site est codifiée en tant que variable qualitative.

Le schéma de la figure 2 visualise ces variables.

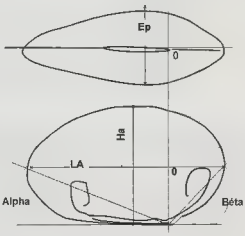



Figure 2. Visualisation des variables mesurés.
LA: longueur antéro-postérieure,
Ha Hauteur; Ep Epaisseur; Alpha: Angle de courbure droit; Béta: Angle de courbure gauche.

Nous utilisons pour l'analyse biométrique les tests de comparaison des moyennes deux à deux, la corrélation entre variables, l'analyse de variance à un facteur, l'analyse discriminante pas à pas, l'analyse en composantes principales et la classification par la méthode des nuées dynamiques (Benzekri, 1973, Baillargeon, 1989, Celeux *et al.*, 1989, Bouroche et Saporta, 1989 et Saporta, 1990)

Pour l'analyse en composantes principales (ACP) nous représentons les nuages de dispersion des individus sur les axes factoriels par les ellipses d'isodensité associés à une probabilité de 90% (afin d'éliminer les points extrêmes). Nous estimons la dispersion des nuages de points dans le plan de l'ACP par les surfaces de ces ellipses et l orientation prise par cette dispersion par les pentes des grands axes (Ben Zekri 1973, Celeux *et al.*, 1989).

Les calculs sont effectués à l'aide des logiciels CHADOC VS et EXCEL.

## RESULTATS

Le tableau 1, représente les moyennes et les variances des variables étudiées, exprimées séparément par site et par caractère.

Tableau 1 Moyennes et variances des variables Longueur antéro-postérieure (LA), Hauteur (Ha), Epaisseur (Ep), Poids de la coquille (PC), Angle de courbure droit (Alpha) et gauche (Béta) pour les différents sites d'étude

| Variable | Site | Aj | Bg | Bi | Ct | Ch | Hc | Kb | Kh | Lt | Ma | Gn | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Effectif** | **90** | **90** | **90** | **90** | **90** | **90** | **90** | **90** | **90** | **90** | **90** | **990** |
| **LA (mm)** | Moyenne | 36,5 | 35,8 | 35,0 | 35,6 | 32,2 | 35,2 | 30,9 | 34,7 | 38,5 | 33,7 | 37,3 | 35,0 |
| | Variance | 8,04 | 6,61 | 9,97 | 11,46 | 9,08 | 9,19 | 12,72 | 11,92 | 13,91 | 9,31 | 12,31 | 14,60 |
| **HA (mm)** | Moyenne | 25,9 | 24,9 | 24,2 | 23,5 | 22,7 | 24,5 | 22,1 | 24,1 | 25,6 | 23,8 | 25,5 | 24,3 |
| | Variance | 3,88 | 2,80 | 4,14 | 5,90 | 3,54 | 4,71 | 6,26 | 4,85 | 5,73 | 4,34 | 4,56 | 5,87 |
| **Ep (mm)** | Moyenne | 16,7 | 15,5 | 15,2 | 15,4 | 14,3 | 16,1 | 13,9 | 15,2 | 16,8 | 15,3 | 16,5 | 15,5 |
| | Variance | 6,82 | 1,22 | 2,06 | 2,45 | 1,28 | 2,24 | 2,51 | 2,11 | 3,34 | 2,59 | 2,44 | 3,41 |
| **PC (gr.)** | Moyenne | 5,1 | 4,3 | 3,7 | 3,3 | 3,3 | 4,6 | 3,1 | 3,7 | 4,3 | 3,9 | 4,4 | 4,0 |
| | Variance | 2,23 | 1,06 | 1,01 | 1,23 | 0,81 | 2,61 | 1,68 | 1,01 | 2,40 | 1,32 | 1,67 | 1,88 |
| **Beta (rad)** | Moyenne | 0,8 | 0,9 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 0,9 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| | Variance | 0,0016 | 0,0022 | 0,0012 | 0,0016 | 0,0018 | 0,0016 | 0,0017 | 0,0015 | 0,0026 | 0,0021 | 0,0022 | 0,0026 |
| **Alpha (rad)** | Moyenne | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| | Variance | 0,0022 | 0,0012 | 0,0009 | 0,0011 | 0,0016 | 0,0013 | 0,0018 | 0,0010 | 0,0012 | 0,0019 | 0,0014 | 0,0022 |

Le tableau 2, représente les écarts réduits des moyennes des différents lots comparés deux à deux, séparément pour chaque caractère On remarque que globalement les moyennes des caractères sont significativement différentes d'un site à l'autre, au seuil de 5%, et ceci pour toutes les variables étudiées. Ainsi, sur 100 combinaisons entre sites par variable, on n'observe au maximum que 13 cas de moyennes comparables: 6 cas seulement pour les variables angles de courbure (Alpha et Béta), 10 pour la Hauteur (Ha), 12 pour la longueur (LA) et le poids de la coquille (PC) et 13 pour l'épaisseur (Ep).

De même, on n'observe pas, pour une variable donnée, des moyennes comparables pour tous les sites. Pour toutes les variables étudiées les moyennes des sites Lt et Bi, ou Ma et Gn ou Aj, Bg et Ch sont toujours significativement différentes.

Tableau 2. Test de comparaison des moyennes entre sites et par variable Tableau des écarts réduits (on admet l'égalité des moyennes entre deux sites si la valeur de l'écart est comprise entre -1.96 et 1.96, valeurs critiques de l'écart réduit au seuil de 5%).

| | Aj | Bg | Ch | Kb | Ma | Gn | Kh | Hi | Lt | Ct | Bi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Longueur antero-postérieure** | | | | | | | | | | | |
| Aj | 0 0 | | | | | | | | | | |
| Bg | -1 7 | 0 0 | | | | | | | | | |
| Ch | -9 7 | -8 6 | 0 0 | | | | | | | | |
| Kb | -11 6 | -10 5 | -2 7 | 0 0 | | | | | | | |
| Ma | -6 4 | -5 0 | 3 2 | 5 6 | 0 0 | | | | | | |
| Gn | 1 8 | 3 4 | 10 4 | 12 2 | 7 4 | 0.0 | | | | | |
| Kh | -3 8 | -2.4 | 5 0 | 7 2 | -2 0 | 5 1 | 0 0 | | | | |
| Hi | -2 9 | -1 3 | 6 6 | -8 7 | -3 4 | 4.3 | -1 2 | 0 0 | | | |
| Lt | 4 2 | 5 8 | 12 5 | 14 1 | -9 6 | -2.3 | 7 3 | 6 6 | 0 0 | | |
| Ct | -1 8 | -0 3 | -7 1 | -9 1 | -4 1 | 3.3 | -1 9 | -0 8 | 5 5 | 0 0 | |
| Bi | -3.3 | -1 8 | -6 1 | -8 3 | -3 0 | 4 7 | -0 7 | 0 4 | 6 9 | 1 2 | 0 0 |

| | Aj | Bg | Ch | Kb | Ma | Gn | Kh | Hi | Lt | Ct | Bi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Hauteur** | | | | | | | | | | | |
| Aj | 0.0 | | | | | | | | | | |
| Bg | -3.7 | 0 0 | | | | | | | | | |
| Ch | -11 0 | -8 2 | 0 0 | | | | | | | | |
| Kb | -11 4 | -8 9 | -2 1 | 0 0 | | | | | | | |
| Ma | -6 8 | -3 8 | 3 7 | 5 2 | 0 0 | | | | | | |
| Gn | -1 4 | 2 0 | 9 1 | 9 8 | 5 2 | 0 0 | | | | | |
| Kh | 5 6 | -2 5 | 4 6 | 5 9 | -1 0 | 4 1 | 0 0 | | | | |
| Hi | -4 4 | -1.2 | 5 9 | -7 1 | -2 2 | 2 9 | -1 2 | 0 0 | | | |
| Lt | -0 9 | 2 3 | 8 9 | 9 7 | -5 3 | -0 4 | 4 2 | 3 1 | 0 0 | | |
| Ct | -7 4 | -4 6 | -2 2 | -9 8 | 1 1 | 5 9 | 2 0 | 3 1 | 5 9 | 0 0 | |
| Bi | -5 9 | -2 6 | -4 9 | -6 3 | -1 1 | 4 2 | -0 1 | 1 2 | 4 4 | -2 1 | 0 0 |

| | Aj | Bg | Ch | Kb | Ma | Gn | Kh | Hi | Lt | Ct | Bi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Epaisseur** | | | | | | | | | | | |
| Aj | 0.0 | | | | | | | | | | |
| Bg | -4 0 | 0 0 | | | | | | | | | |
| Ch | -8 0 | -7.3 | 0 0 | | | | | | | | |
| Kb | -8 8 | -8 1 | -2 2 | 0 0 | | | | | | | |
| Ma | -4 4 | -1 1 | 4.7 | 6 0 | 0 0 | | | | | | |
| Gn | -0 7 | 4 7 | 10 7 | 11 1 | 5 0 | 0 0 | | | | | |
| Kh | -4 8 | -1 7 | 4 6 | 5 9 | 0 4 | 5 7 | 0 0 | | | | |
| Hi | -2 1 | 2 8 | 8 9 | -9 6 | -3 3 | 1 8 | -3 9 | 0 0 | | | |
| Lt | 0 2 | 5 7 | 11 0 | 11 5 | -5 8 | -1 3 | 6 5 | 2 9 | 0 0 | | |
| Ct | -4 2 | -0 7 | -5 3 | -6 4 | -0 3 | 4 7 | -0 8 | 3 0 | 5 6 | 0 0 | |
| Bi | -4 9 | -1 7 | -4 7 | -5 9 | 0 4 | 5 8 | 0 0 | 4 0 | 6 6 | 0 8 | 0 0 |

| | Aj | Bg | Ch | Kb | Ma | Gn | Kh | Hi | Lt | Ct | Bi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Poids coquille** | | | | | | | | | | | |
| Aj | 0 0 | | | | | | | | | | |
| Bg | -3 8 | 0 0 | | | | | | | | | |
| Ch | -9 7 | -7 4 | 0 0 | | | | | | | | |
| Kb | -9 2 | -6 8 | -0 8 | 0 0 | | | | | | | |
| Ma | 5 9 | -2 8 | 3 9 | 4 0 | 0 0 | | | | | | |
| Gn | -3 1 | 0 5 | 6 9 | 6 6 | 3 0 | 0 0 | | | | | |
| Kh | -6 9 | -3 9 | 3 3 | 3 5 | 0 9 | 3 9 | 0 0 | | | | |
| Hi | 2 0 | 1 4 | 6 8 | 6 7 | 3 5 | -0 8 | 4 3 | 0 0 | | | |
| Lt | -3 3 | 0 0 | 5 6 | 5 6 | -2.2 | 0 5 | 3 0 | -1 2 | 0 0 | | |
| Ct | 9 1 | -6 6 | 0 0 | -0 7 | 3 6 | 6 4 | 3 0 | 6 4 | 5 2 | 0 0 | |
| Bi | -7 1 | 4 1 | -3 1 | -3 3 | 1 0 | 4 1 | 0 2 | 4 4 | 3 2 | -2 8 | 0 0 |

| | Aj | Bg | Ch | Kb | Ma | Gn | Kh | Hi | Lt | Ct | Bi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Béta** | | | | | | | | | | | |
| Aj | 0 0 | | | | | | | | | | |
| Bg | 4.1 | 0 0 | | | | | | | | | |
| Ch | 0 9 | -3 2 | 0 0 | | | | | | | | |
| Kb | -2 2 | -6 1 | -3 1 | 0 0 | | | | | | | |
| Ma | -2 4 | -6 1 | -3 3 | -0 3 | 0 0 | | | | | | |
| Gn | -6.9 | -10 2 | -7 6 | -4 7 | -4 2 | 0 0 | | | | | |
| Kh | 4 2 | -0 3 | 3 2 | 6 4 | -6 4 | -11 0 | 0 0 | | | | |
| Hi | 3 0 | -1 3 | 2.0 | -5.2 | -5 2 | -9 7 | 1 1 | 0 0 | | | |
| Lt | -7 2 | -10 4 | -7 9 | -5 2 | 4 7 | 0 6 | -11 1 | -9 9 | 0 0 | | |
| Ct | -8 9 | -12 2 | 9 6 | 6 5 | 5 8 | 1.2 | 13 4 | 11 9 | 0 5 | 0 0 | |
| Bi | -5 9 | -9 7 | 6 8 | 3 4 | 2 8 | -2 0 | 10 7 | 9 1 | -2 6 | -3 7 | 0 0 |

| | Aj | Bg | Ch | Kb | Ma | Gn | Kh | Hi | Lt | Ct | Bi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Alpha** | | | | | | | | | | | |
| Aj | 0 0 | | | | | | | | | | |
| Bg | 11 3 | 0 0 | | | | | | | | | |
| Ch | -5 6 | 5 9 | 0 0 | | | | | | | | |
| Kb | -1 5 | 10 3 | 4 3 | 0 0 | | | | | | | |
| Ma | -3 9 | 7 4 | 1 7 | -2 5 | 0 0 | | | | | | |
| Gn | -8 3 | 3 1 | -2 8 | -7 2 | -4 4 | 0 0 | | | | | |
| Kh | -12 8 | 1 7 | -7 5 | -12 0 | 9 0 | 4 7 | 0 0 | | | | |
| Hi | -3 0 | 9 7 | 3 1 | 1 5 | 1 3 | 6 3 | -11 5 | 0 0 | | | |
| Lt | -13 5 | -2 7 | -8 3 | -12.7 | 9 8 | 5 6 | -1 1 | -12 2 | 0 0 | | |
| Ct | -14 4 | -3 6 | 9 3 | 13 7 | 10 7 | 6 6 | 2 0 | 13 4 | 0 8 | 0 0 | |
| Bi | -8 5 | 4 1 | 2 5 | 7 3 | 4 3 | -0 6 | -6 0 | 6 3 | -6 9 | -8 0 | 0 0 |

La matrice de corrélation entre variables (tableau 3) montre que les caractères liés à la taille et au poids (LA, Ha, Ep et PC) sont fortement corrélés, positivement, entre eux (coefficient de corrélation de 0.8 à 0.92) mais faiblement corrélés avec ceux liés à la symétrie de la coquille, négativement pour Alpha (-0.2) et positivement pour Béta (0.03). Par ailleurs, ces deux derniers caractères ne sont pas corrélés entre eux (-0.0005).

Tableau 3 matrice de corrélation entre variables

| | L. ant-post | Hauteur | Epaisseur | Poids coquille | Alpha | Beta |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **L. ant-post** | 1.000 | | | | | |
| **Hauteur** | 0.915 | 1.000 | | | | |
| **Epaisseur** | 0.817 | 0 840 | 1.000 | | | |
| **Poids coquille** | 0.803 | 0 889 | 0.832 | 1.000 | | |
| **Alpha** | -0 204 | 0.033 | 0.011 | 0.130 | 1.000 | |
| **Beta** | -0.221 | -0.084 | -0.116 | 0.005 | -0 005 | 1.000 |

Pour l'analyse discriminante pas à pas, le rapport de Fisher (tableau 4) le plus élevé est celui relatif aux variables Alpha et Béta (respectivement 26.9 et 26.8). Pour les autres variables (LA, Ha et PC) ce rapport est beaucoup plus faible (14 17 au maximum), alors que la variable épaisseur a un rapport de Fisher non significatif, à 95% de certitude.

Tableau 4. Analyse discriminante pas à pas. Rapports de Fisher à 10, 981 degrès de liberté

| Variables | Alpha | Béta | Longueur | Poids coquille | Hauteur |
|---|---|---|---|---|---|
| **Rapport de Fisher** | 26.94 | 26.83 | 14.17 | 11.50 | 9.30 |

L évolution du coefficient lambda de Wilks (figure 3), montre que l'introduction, dans l'analyse, des variables PC, Ha et Ep n'améliore pas sensiblement la discrimination. Ce coefficient ne diminue que très légèrement à l'introduction de ces variables.

Il se dégage que les caractères Alpha, Béta et LA sont les plus discriminants des lots étudiés.

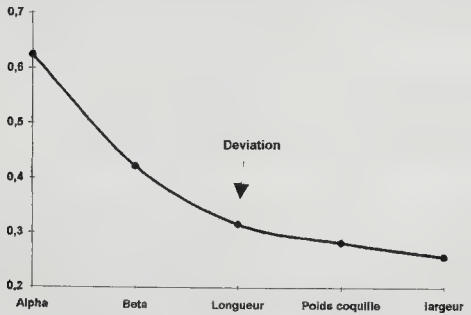



Figure 3. Analyse discriminante pas à pas. Evolution du coefficient lambda de Wilks

Se référant par ailleurs aux taux des individus bien classés qui n'est que de 40%, cette discrimination s'avère non absolue.

Pour l'analyse de variance à un facteur et pour toutes les variables étudiées, l'inertie globale intra lots est toujours supérieure à l'inertie globale inter-lots (Tableau 5). Les rapports d'inertie intra/inter sont dans l'ordre croissant 1.65 pour Alpha, 2.25 pour Béta et 2.4 pour LA. Ce rapport dépasse 3 pour les autres caractères.

Tableau 5. Inertie globale inter et intra- sites (Résultats de l'analyse de variance à un facteur)

| | L. ant-post. | Hauteur | Epaisseur | Poids coquille | Alpha | Bêta |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Inertie inter-sites** | 4273 | 1296 | 788 | 344 | 0.84 | 0.8 |
| **Inertie intra-sites** | 10257 | 4543 | 2602 | 1523 | 1.39 | 1.8 |
| **Rapport inertie** (intra/inter) | **2.40** | **3.51** | **3.30** | **4.43** | **1.65** | **2.25** |

Le premier axe de l'analyse en composantes principales est caractérisé par les caractères quantitatifs de la dimension (LA, Ha et Ep) et du poids de la coquille (PC). Ces variables, fortement corrélées entre elles, sont aussi très corrélées, négativement avec l'axe 1. Le deuxième axe factoriel est caractérisé par les variables liées à la symétrie de la coquille (angles de courbure droit et gauche). Ces variables sont corrélées positivement avec l'axe 2. L'axe 3 oppose l'angle Alpha dans ses valeurs positives à l'angle Bêta, dans ses valeurs négatives. Les plans des axes factoriels (1, 2) et (1, 3) expliquent respectivement 77% et 75% de la variabilité totale.

La représentation graphique des centres de gravité des nuages de points des individus des différents lots, dans le plan factoriel (1, 2) (figure 4) permet d'opposer sur le premier axe, les lots provenant de Karkoub et de Chikh yahia, tailles et poids faibles, aux sites d'Ajim, Grine et Lac de Tunis, tailles et poids les plus élevés. Sur le deuxième axe factoriel les lots de Hchichina et d'Ajim

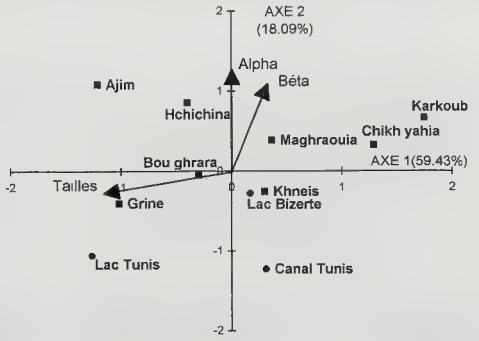



Figure 4. Analyse en composantes principales. Centre de gravité des nuages de points projetés sur le plan des axes factoriels 1 et 2.

se distinguent par des angles de courbures élevées, par opposition aux lots de la région de Tunis (Canal et Lac).

Le plan des axes factoriels 1 et 3, (figure 5) permet de distinguer essentiellement les lots de Khneis et de Bou Ghrara, caractérisés par une forte dissymétrie vers la gauche de la valve, en comparaison au reste des lots.

Notons que les individus provenant de Bizerte et de Maghraouia ont des caractéristiques intermédiaires quant aux variables tailles et angles de courbure puisque toujours situés autour de l'origine des axes.

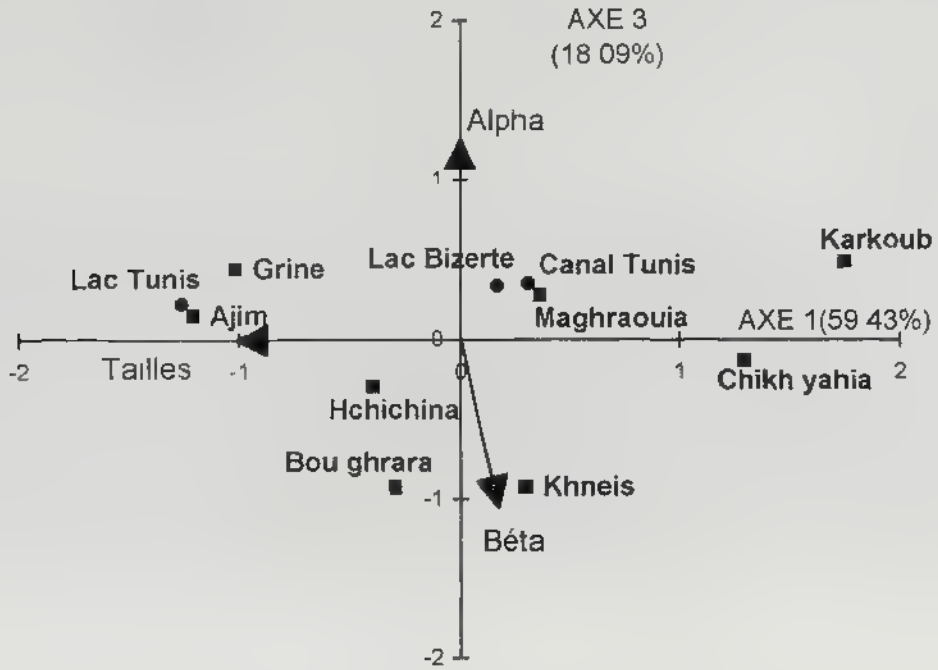



Figure 5 Analyse en composantes principales. Centre de gravité des nuages de points projetés sur le plan des axes factoriels 1 et 3

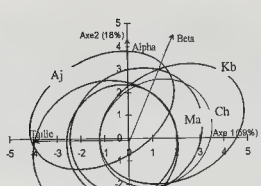
On peut distinguer de même des sites à majorité globuleuse dont l'exemple type est celui de karkoub (Taille faible et courbure élevée), et d'autres à majorité étirée comme c'est le cas dans l'exemple du Lac de Tunis.

Les ellipses de dispersion autour des axes 1 et 2 (figure 6 a, b et c) et des axes 1 et 3 (figure 6 d, e et f), associés à une probabilité de 90%, se recouvrent largement autour des origines, et présentent des surfaces de dispersion variables aussi bien en amplitude qu'en orientation.

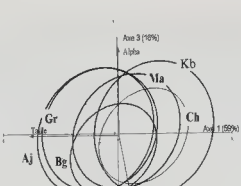
Les rapports des surfaces entre les sites (tableau 6) permet de distinguer, aussi bien dans le plan des axes 1 et 2 que dans celui des axes 1 et 3,.le lot Lt, à variabilité interne la plus forte, des lots Ch ou Bg à variabilité interne la plus faible (rapports supérieurs au double).

Les pentes des grands axes des différents ellipses de dispersion sont toutes positives et orientées vers les valeurs positives des axes 1,2 et 3. La dispersion des différents lots est orientée vers les fortes valeurs des angles Alpha ainsi que les faibles dimensions et poids de la coquille.

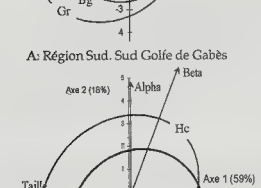
On peut distinguer sur le plan des axes 1 et 2 le lot Lt (pente de 0.31) dont la dispersion est orientée plutôt vers la longueur (Axe 1) des lots Ch, Bg, Ra, Hc (pente supérieure à 0.5) dont la dispersion est plutôt orientée vers les variables liées à la symétrie (Axe 2).



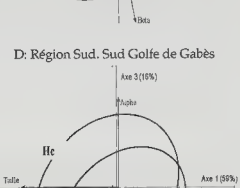

A: Région Sud. Sud Golfe de Gabès



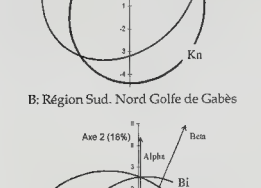

D: Région Sud. Sud Golfe de Gabès



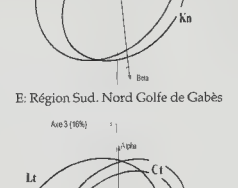

B: Région Sud. Nord Golfe de Gabès




E: Région Sud. Nord Golfe de Gabès




C: Région Nord. Tunis et Bizerte




F: Région Nord. Tunis et Bizerte

Figure 6. Analyse en composantes principales. Ellipses d'isodensité associés à une propabilité de 90% projetés sur les axes factoriels 1, 2 (A,B et C) et 1,3 (D,E et F) .Bi: Bizerte. Lt: Lac de Tunis. Ct: Canal de Tunis. Kn: Khneis Hc: Hchichina. Ma: Maghraouia Gr. Grine. Bg Bou-Ghrara. Kb: Karkoub Aj· Ajim. Ch: Chikh yahia.

Tableau 6. Rapports des surfaces des ellipses de dispersion des individus des différents sites projetés sur les axes factoriels (1,2) et (1,3).

| | Lt | Hc | Gn | Kb | Ma | Bi | Kh | Aj | Ct | Bg | Ch |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lt | 1 | 0,70 | 0,70 | 0,67 | 0,65 | 0,62 | 0,60 | 0,58 | 0,58 | 0,49 | 0,49 |
| Hc | 1,43 | 1 | 1,00 | 0,96 | 0,93 | 0,89 | 0,86 | 0,83 | 0,83 | 0,71 | 0,70 |
| Gn | 1,44 | 1,00 | 1 | 0,96 | 0,93 | 0,90 | 0,86 | 0,83 | 0,83 | 0,71 | 0,70 |
| Kb | 1,50 | 1,04 | 1,04 | 1 | 0,97 | 0,93 | 0,90 | 0,87 | 0,86 | 0,74 | 0,73 |
| Ma | 1,54 | 1,08 | 1,07 | 1,03 | 1 | 0,96 | 0,92 | 0,90 | 0,89 | 0,76 | 0,75 |
| Bi | 1,60 | 1,12 | 1,12 | 1,07 | 1,04 | 1 | 0,96 | 0,93 | 0,93 | 0,79 | 0,78 |
| Kh | 1,67 | 1,17 | 1,16 | 1,12 | 1,08 | 1,04 | 1 | 0,97 | 0,96 | 0,82 | 0,81 |
| Aj | 1,72 | 1,20 | 1,20 | 1,15 | 1,12 | 1,07 | 1,03 | 1 | 0,99 | 0,85 | 0,84 |
| Ct | 1,73 | 1,21 | 1,21 | 1,16 | 1,12 | 1,08 | 1,04 | 1,01 | 1 | 0,85 | 0,85 |
| Bg | 2,03 | 1,42 | 1,41 | 1,36 | 1,31 | 1,26 | 1,21 | 1,18 | 1,17 | 1 | 0,99 |
| Ch | 2,05 | 1,43 | 1,43 | 1,37 | 1,33 | 1,28 | 1,23 | 1,19 | 1,18 | 1,01 | 1 |

a) Axes (1,2)

| | Lt | Kb | Aj | Hc | Gn | Ct | Ma | Bi | Kh | Ch | Bg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lt | 1 | 0,95 | 0,87 | 0,87 | 0,82 | 0,78 | 0,71 | 0,60 | 0,56 | 0,49 | 0,44 |
| Kb | 1,05 | 1 | 0,92 | 0,92 | 0,86 | 0,82 | 0,75 | 0,63 | 0,59 | 0,51 | 0,46 |
| Aj | 1,15 | 1,09 | 1 | 1,00 | 0,94 | 0,89 | 0,81 | 0,69 | 0,65 | 0,56 | 0,50 |
| Hc | 1,15 | 1,09 | 1,00 | 1 | 0,94 | 0,89 | 0,81 | 0,69 | 0,65 | 0,56 | 0,50 |
| Gn | 1,22 | 1,16 | 1,06 | 1,06 | 1 | 0,95 | 0,87 | 0,73 | 0,69 | 0,59 | 0,54 |
| Ct | 1,29 | 1,22 | 1,12 | 1,12 | 1,05 | 1 | 0,91 | 0,77 | 0,72 | 0,63 | 0,57 |
| Ma | 1,41 | 1,34 | 1,23 | 1,23 | 1,15 | 1,10 | 1 | 0,85 | 0,79 | 0,69 | 0,62 |
| Bi | 1,67 | 1,58 | 1,45 | 1,45 | 1,37 | 1,30 | 1,18 | 1 | 0,94 | 0,81 | 0,73 |
| Kh | 1,78 | 1,69 | 1,55 | 1,55 | 1,46 | 1,38 | 1,26 | 1,07 | 1 | 0,87 | 0,78 |
| Ch | 2,06 | 1,95 | 1,79 | 1,79 | 1,68 | 1,60 | 1,46 | 1,23 | 1,16 | 1 | 0,90 |
| Bg | 2,28 | 2,16 | 1,99 | 1,98 | 1,87 | 1,77 | 1,62 | 1,37 | 1,28 | 1,11 | 1 |

b) Axes (1,3)

Tableau 7. Pentes des ellipses de dispersion de l'ACP.

| | Ch | Bg | Aj | Ra | Hc | Kb | Kn | Ct | Gn | Bi | Lt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Axe 1,2** | 0,62 | 0,57 | 0,54 | 0,52 | 0,51 | 0,47 | 0,42 | 0,40 | 0,40 | 0,39 | 0,31 |
| **Axe 1,3** | 0,66 | 0,70 | 0,53 | 0,61 | 0,42 | 0,49 | 0,49 | 0,46 | 0,55 | 0,45 | 0,52 |

La méthode des nuées dynamiques permet de grouper les individus, représentés respectivement par les valeurs des caractères Alpha, Béta et LA, en quatre classes L'inertie inter classes ainsi obtenue, pour chaque caractère est de 84% de l'inertie totale. Le tableau 8 représente les moyennes, les écarts type, les minimas et les maxımas de chacune de ces classes, respectivement pour chaque variable.

Tableau 8. Méthode des nuées dynamiques. Classification des individus, respectivement, selon les caractères angle de courbure droit (Alpha), angle de courbure gauche (Béta) et longueur antéro-postérieure (LA).

| Caractère | Alpha | | | | Béta | | | | LA | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Classe | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Effectif | 298 | 125 | 273 | 300 | 219 | 238 | 235 | 304 | 176 | 360 | 331 | 129 |
| Moyenne | 0 422 | 0.454 | 0.48 | 0.532 | 0.764 | 0.813 | 0 845 | 0.892 | 29 6 | 33.6 | 36 9 | 41.6 |
| Ecart type | 0.016 | 0 | 0.009 | 0.028 | 0.025 | 0.009 | 0 009 | 0.025 | 1.88 | 1.03 | 1.03 | 2.13 |
| Mınimum | 0.367 | 0.454 | 0.471 | 0.506 | 0 663 | 0.803 | 0.838 | 0.873 | 20.9 | 31.7 | 35.3 | 39.3 |
| Maxımum | 0.437 | 0.454 | 0.489 | 0.681 | 0 785 | 0 82 | 0.855 | 0.995 | 31.6 | 35.2 | 39.2 | 52 |

La combinaison entre ces classes permet de ressortir les caractéristiques de phénotypes particuliers (Tableau 9) à savoir· le groupe, caractérisé par la combinaison entre les classes à faible longueur et angles de courbure gauche et droite élevés(aspect globuleux), le groupe représentant la combinaison entre les classes de longueur élevée et de faibles angles Alpha et Béta (aspect effilé) et le groupe représenté par les individus des classes Alpha faible, Béta élevé et longueur moyenne (aspect tronqué).

Tableau 9. Caractéristiques de phénotypes particuliers, obtenus par des combinaisons entre individus après classification par la méthode de nuées dynamiques réalisée sur les variables Alpha, Bèta et LA.

| | Aspect globuleux | | | Aspect effilé | | | Aspect tronqué | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Alpha | Béta | LA | Alpha | Béta | LA | Alpha | Béta | LA |
| Moyenne | 0.53 | 0.89 | 29.8 | 0.42 | 0.77 | 42.0 | 0.42 | 0.90 | 35.4 |
| Ecart type | 0.03 | 0.02 | 1.6 | 0.02 | 0.02 | 2.4 | 0.02 | 0.03 | 2.0 |
| Minimum | 0.51 | 0.87 | 23.6 | 0.38 | 0.72 | 39.5 | 0.38 | 0.87 | 31.7 |
| Maximum | 0.59 | 0.96 | 31.6 | 0.44 | 0.79 | 50.3 | 0.44 | 0.99 | 39.1 |

## DISCUSSION

La comparaison des caractères quantitatifs analysés, entre les différents lots étudiés de palourdes, permet, si l'on se base uniquement sur les moyennes des caractères ou sur les centres de gravité et les étendues des nuages de points de l'ACP, de distinguer, en première analyse, les lots les uns des autres des lots à tailles et poids faibles (Karkoub et Chikh yahia), des lots à tailles et poids les plus élevés (Ajim, Grine et Lac de Tunis), des lots à angles de courbures élevés (Hchichina et Ajim), des lots à forte dissymétrie vers la gauche de la valve (Khneis et Bou Ghrara). On peut distinguer de même des sites hétérogènes (Lac de Tunis et Karkoub) et d'autres homogènes (Chikh yahia ou Bou Ghrara).

Cependant, une analyse plus approfondie de la variabilité inter et intra sites et de la dispersion des individus dans l'espace occupé par la totalité de la population, montre que cette différentiation entre sites n'est que relative. En effet, d une part toutes les ellipses d isodensité se chevauchent autour de l'origine des axes de l'ACP et l'inertie globale intra - lots est toujours supérieure à l'inertie globale inter - lots pour tous les caractères étudiés. D'autre part l'analyse discriminante ne donne que 40% d individus bien classés (même si elle aboutit à un pouvoir discriminant global significatif entre les sites).

On ne peut dès lors conclure à l'existence d'un phénotype caractéristique d'un site ou d'une région donnée et la différenciation entre sites ou régions est difficile à établir.

Ces conclusions rejoignent celles des travaux de divers auteurs réalisés dans d'autres régions, méditerranéennes ou atlantiques, et abordant le problème par des méthodes d'électrophorèse enzymatique. Selon Moraga (1984), bien que la morphologie de la coquille puisse varier, les différences biométriques observées sont très faibles et une grande similitude génétique existe entre les populations naturelles étudiées De même Jarne (1988), travaillant sur des populations géographiquement distantes, trouve des distances génétiques faibles entre ces populations éloignées mais une variabilité génétique élevée au sein de certaines populations. L'auteur conclut que "la distinction peu marquée des échantillons, indique que le polymorphisme inter-populationel est quantitativement peu supérieur à celui qui existe au sein des populations". Il explique de même, que les différences morphologiques observées peuvent être dues, simplement, aux conditions de croissance des échantillons étudiés.

De façon générale, les conditions écologiques semblent influencer fortement la morphologie et la physiologie des bivalves (Lucas, 1981). Gérard (1978), a montré que la nature du substrat avait une influence considérable sur l'effilement de la coquille. Le substrat peut de même agir sur la survie et la croissance de naissains de *R. decussatus* en prégrossissement (Medhioub *et al.* 1996). Salvidio et Monti (1986) citent qu'une variation brutale du milieu peut aboutir à une modification de la structure génétique des populations naturelles de *R decussatus* Les variations de la salinité et le stress de l'environnement peut affecter même la constitution génétique chez d'autres mollusques bivalves (Koehn *et al.*, 1976, Bulnheim et Gosling, 1988; Scott et Koehn, 1990, Borsa *et al.*, 1992, Fava *et al.*, 1994).

On ne peut exclure dans l'analyse de nos résultats des effets de l'environnement sur la morphologie de la palourde, dans la mesure ou le parcage d'individus, issus d'une région, dans une autre région ou encore la migration planctonique des larves, sont susceptibles de créer un brassage continu ou comme l'indique Jarne (1988) un flux génique homogénéisateur entre les différents sites et régions étudiés

Par ailleurs, même si l'on considère que les différents lots étudiés ont une origine commune, il est possible de distinguer des phénotypes différents.

Ainsi, se basant sur les résultats de l'analyse discriminante et sur les variables caractérisant les différents axes de l'ACP, Il apparaît clairement que les caractères essentiels de différenciation entre les individus sont, en premier lieu, l'angle de courbure droit et gauche et en second lieu, la longueur antéro-postérieure de la coquille. La méthode des nuées dynamiques, conduite séparément sur chaque caractère, donne une classification optimale des individus. La combinaison entre ces classes sur la base de ces trois caractères permet de définir:

- des phénotypes à grand angles de courbure et à faible longueur, ayant un aspect dit globuleux,
- des phénotypes à faibles angles de courbure et à grande longueur, ayant un aspect dit effilé,
- des phénotypes à grand angle de courbure gauche par rapport à celui de droite, ayant un aspect dit tronqué ou dissymétrique,

Ces trois phénotypes sont disposés dans des cadrans opposés des plans de l'ACP (axe 1, axe 2) et (axe 1, axe 3). Chaque site est constitué d'un mélange en proportions différentes de ces phénotypes.

## CONCLUSION

Ce travail donne un aperçu général sur la morphométrie de la palourde sur les côtes tunisiennes. Les résultats obtenus confirment le polymorphisme accentué de cette espèce Ainsi on ne peut discerner statistiquement des différences inter sites ou régions Cependant, au sein de l'ensemble de la population on peut isoler, les caractères morphométriques de trois phénotypes différents: globuleux, effilé ou tronqué.

Cette différentiation peut constituer une base de sélection de reproducteurs en vue d'isoler éventuellement, en élevage, une progéniture à fort potentiel de croissance, de fécondité ou de survie, comme elle peut guider dans le choix d'individus pour une étude génétique plus approfondie

## BIBLIOGRAPHIE

Arnaud P. & Raimbault R , 1963 Note préliminaire sur la palourde (*Tapes decussatus* L.) de l Etang de Thau. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes*, **27**(2): 195-202.

Baillargeon G , 1989. Probabilité, statistiques et techniques de régression. Ed SMG Quebec Canada: 320-386.

Benzecri J.P., 1973. L'analyse des données II Ed. Dunod, Paris. 619 p.

Borsa P., Jousselin Y.et Delay B , 1992 Relationships between allozymic heterozygosity, body size and survival to natural anoxic stress in the palourde *Ruditapes decussatus* L. (Bivalvia: Veneridae) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **155**: 169-181

Bouroche J M & Saporta G , 1989 L analyse des données. Que sais je? Ed. Presses Univ de France 4ème édition 127 p

Bulnheim H.P.et Gosling E., 1988. Population genetic structure of mussels from the Baltic Sea *Helgolander Meeresuntersuchungen*, **42**: 113-129.

Celeux G., Diday E., Govaert G., Lechevallier Y. & Ralambondrany H , 1989. Classification automatique des données. Environnement statistique et informatique. Ed Bordas, Paris: 195-224

Fava G., Fonsatti E et Meggiato L., 1994 Genetic study on two Adriatic lagoon populations of the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Life*, **4**(2): 23-32.

Gérard A., 1978 Recherches sur la variabilité de diverses populations de *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* (Veneridae, Bivalvia) *These 3ème cycle, Université de Brest* 149 p

Huelvan S., 1985. Variabilité génétique de populations de *Pecten maximus* L. en Bretagne. *Thèse 3ème cycle. Université de Bretagne Occidentale*. 196 p.

Jarne P, Berreb P. & Guélorget, 1988. Variabilité génétique et morphométrique de cinq populations de la palourde *Ruditapes decussatus*. *Oceanologica Acta*, **11**: 401-407.

Koehnen R.K., Milkman R. & Mitton J.B , 1976. Population genetics of marine Pelecypods IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution*, **30**: 2-32.

Lubet P., 1973. Exposé systématique des données biologiques sur la moule *Mytilus edulis*. *Lmk FAO*, 88, 1-8 5.

Lucas A., 1981. Adaptations écophysiologiques des bivalves aux conditions de culture. *Bulletin de la Société d'Ecophysiologie*, **6**(1-2): 27-35.

Medhioub M N., 1993. La conchyliculture en Tunisie. Projet Tunis /92/002/ Direction Générale de la pêche et de l'aquaculture. PNUD/FAO. 83p.

Medhioub M N & Limayem Y., 1996. Effet d un substrat sur la survie et la croissance de la palourde *Ruditapes decussatus* en phase de prégrossissement 2 *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer. Salambô*, **23** (sous presse).

Moraga D., 1984. Polymorphisme enzymatique de populations naturelles et expérimentales de la palourde europeenne *Ruditapes decussatus* (L.) (Veneridae, Bivalvia) *Thèse de 3ème cycle, Université de Bretagne Occidentale*. 105 p.

Moraga D. & Lucas A., 1983. Polymorphisme enzymatique de trois populations de palourdes (*Ruditapes decussatus* L.) de Bretagne *Bases biologiques de l'aquaculture*. Monpellier 1983 I.F.R.E.M.E.R. *Actes de colloques* n° 1: 139 -150.

Parache A., 1982. La palourde. *La pêche maritime*. Septembre 1982: 496-507.

Perez A., 1980. Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linné, 1767) (Mollusca, Bivalvia), con especial referencia a los factores determinantes de la producción. *Boletin del Instituto Español de Oceanografía*, **5**: 43-76.

Salvidio S. & Monti D , 1986 - Un exemple de l influence du milieu sur la composition génétique chez une population de palourdes *Ruditapes decussatus* (Mollusca Bivalvia) de l étang de Thau. *Océanis*, **12**(4): 285 290.

Saporta G., 1990. Probabilités, analyse des données et statistique. Ed. Technip, Paris: 199-232.

Scott T.M. & Kohen R K., 1990. The effect of environmental stress on the relationships of heterozygosity to growth rate in the coot clam *Mulinia lateralis* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **135** 109-116.

Seed R., 1972 A physiological and biochemical approach to the taxonomy of *Mytilus edulis* (L.) and *Mytilus galloprovincialis* Lmk, from S.W. of England. *Cahiers de Biologie Marine*, **12**(3): 291-322.

Vilela H., 1950. Vida bentonica de *Tapes decussata* L. *Arquivos do Museu Bocage*, **21** 1-120.

Wilkins N P., 1975. Genic variability in marine Bivalvia implications and applications in molluscan mariculture - *10 th European Symposium of Marine Biology*, 1 549 563.

Worms J. & Pasteur N., 1982. Polymorphisme biochimique de la palourde *Venerupis decussata* de l'étang de Prévot (France). *Oceanologica Acta*, **5**: 395-397.

Zaouali J., 1984. La pêche dans les lagunes tunisiennes *Etudes et Revues*. CGPM (61) Vol. 1. 438p.

# Reproduction de la Coquille St. Jacques sur les côtes de Cornouaille et du S.W. de l'Angleterre (U.K.). Comparaison avec d'autres secteurs de l'aire de répartition de l'espèce

*Pierre LUBET* [1] *et Peter DARE* [2]

ABSTRACT

**Reproduction of the Scallop off the coasts of Cornwall and S.W. England. Comparison with other parts of the species' range.**

The study of populations of *Pecten maximus* L. harvested off the coasts of Cornwall and in the Celtic sea (U.K.) between 30 m and 135 m, has enabled one to follow the evolution of the gonad index, of the stages of sexual development and of the muscle index. Examination of results from 1985-86 and 1990-91 has shown that the annual sexual cycle is practically continous at all stations, the cytologic examination revealing the existence of several cohorts of oocytes evolving successively in the course of the year when asynchronism is frequent between the different regions of the gonad of each individual. From 20 to 40% of oocytes become atretic by lysis. Several peaks of spawning have been recorded, they vary according to the year and permit spreading of the periods of reproduction and recruitment in July 1990, the examination at closely spaced sampling dates of populations between 35m and 135m revealed the existence of a synchronism between individuals at the level of sexual evolution and spawning. This last could depend on substances emitted or contained in the phytoplankton. The variations of the muscle index are similar to those observed among populations of the Bay of Seine.

Comparison of different fisheries in this area of the species' range shows that, with the exception of populations in the Bay of St. Brieuc, all populations present a continous sexual cycle, with the spreading of reproduction period varying as a function of seasonal thermal deviations, and the fecundity dependent on the importance of oocytic atresia. Some hypotheses are put forward in attempt to explain the particular behaviour of the populations of the bay of St. Brieuc.

RÉSUMÉ

L'étude de populations de *Pecten maximus* L, récoltées sur les côtes de Cornouaille et en Mer Celtique (U.K.) entre 30 m et 135 m de profondeur, a permis de suivre l'évolution de l'index gonadique, des stades de développement sexuel et de de l'index musculaire. L'examen des résultats en 1985-86 et 1990-91 a montré que le cycle sexuel annuel est pratiquement continu dans toutes les stations, l'examen cytologique révélant l'existence de plusieurs cohortes d'ovocytes évoluant successivement au cours de l'année alors qu'un asynchronisme est fréquent entre les différentes régions de la gonade de chaque individu. 20 à 40 % d'ovocytes deviennent atrétiques puis se lysent. Plusieurs pics de ponte ont été repérés, ils varient suivant l'année et permettent l'étalement de la période de reproduction et du recrutement. En juillet 1990, l'examen à

[1] I.B.B.A, Biologie et Biotechnologies marines, Université, F-14032 Caen, France

[2] Ministery of Agriculture, Fisheries & Food, Fisheries Laboratory, Lowestoft, Suffolk, NR33OHT, U.K.

des dates très rapprochées de populations échelonnées entre -35 et -135 m a révélé l existence d'un synchronisme entre les individus au niveau de l'évolution sexuelle et de la ponte. Ce dernier pourrait dépendre de substances émises ou contenues dans le phytoplancton. Les variations de l'index musculaire sont similaires à celles observées chez les populations de la baie de Seine.

La comparaison des différentes pêcheries dans l'aire de répartition de l'espèce montre qu'à l'exception des populations de la baie de St Brieuc, chez toutes les populations présentant un cycle sexuel continu, l'étalement de la période de reproduction varie en fonction des écarts thermiques saisonniers et la fécondité dépend de l'importance de l'atrésie ovocytaire Des hypothèses sont émises pour tenter d'expliquer le comportement particulier des populations de la baie de St. Brieuc.

La mise en œuvre d'une collaboration franco-britannique a permis d'étendre au littoral sud-ouest du Royaume Uni nos investigations sur les stratégies de reproduction de la Coquille St. Jacques. Les populations des côtes de Cornouaille constituent une des plus importantes pêcheries de cette espèce dans les Iles Britanniques. Elles présentent l'intérêt de se situer dans une zone intermédiaire entre les pêcheries d'Ecosse très bien étudiées par les auteurs anglo-saxons (revue *in* Mason, 1983) et celles des côtes françaises de la Manche qui ont été l'objet de recherches récentes (revue *in* Lubet *et al.*, 1991).

## MATERIEL ET METHODES

### *Zone prospectée*

Elle se situe dans la zone littorale des côtes de Cornouaille (baies de Falmouth et de Veryan) et à l ouest de l'Angleterre où plusieurs prélèvements ont été effectués sur le plateau continental (Fig. 1). Six stations ont été étudiées pendant les années 1985-1986 et 1990-1991. Elles présentent l'intérêt d'être échelonnées entre 30 m et 135 m de profondeur: Manacles: 30-45 m, Coverack: 45-50 m, Gerrans 40-55 m, Old Walls: 40 m, Wolf Rock· 90-105 m, S SW des Iles Scilly : 135m. Seules les stations côtières ont fait l'objet d'un suivi mensuel, des échantillons d'au moins 20 individus d'une taille supérieure à 80 mm ayant été récoltés. En effet, la première ponte se produit chez des animaux compris entre 60 et 73 mm de hauteur, 50% des individus de 75 à 79 mm ayant pondu ou étant capable de pondre et plus de 90 % de ceux supérieurs à 80 mm. (Dare, 1992).

### *Index gonadique et musculaire*

*L'index gonadique* (GI) le plus utilisé par les auteurs français ou GI 2 = Poids frais de la gonade (g) x 100 / Poids de la coquille (g) Les auteurs anglo-saxons préfèrent calculer le GI 3 = Poids de la gonade (g) x 100 / Cube de la Hauteur de la coquille (cm), (Dare, 1992). Afin de comparer les résultats de ces méthodes, nous avons calculé les valeurs du GI 2 et GI 3 pour une population de la baie de Seine en 1985-86 et 1990-91. Les variations du GI restent similaires pour une même année, population et classe d'âge, la relation simple GI 2 = 16, 8 GI 3 liant ces deux index.

*L'Index musculaire* (MI), pour les mêmes raisons est calculé par les auteurs soit comme MI 2 = Poids du muscle (g) x 100 / Poids de la coquille (g) soit comme MI 3 = Poids du muscle (g) / Cube de la Hauteur de la coquille (cm). Les études menées en baie de Seine montrent que les variations restent similaires et que MI 2 = 15,9 MI 3. GI 3 et MI 3 ont été calculés simultanément en 1990-91 pour les populations de la Cornouaille et de la baie de Seine.

### *Cycle sexuel*

Nous avons appliqué les méthodes d'histologie quantitative déjà mises en oeuvre (Lubet *et al*, 1991) sur des lots d'au moins 10 individus de chaque station provenant de prélèvements mensuels de 1990-91. Pour 1985-86, nous avons effectué le même travail à partir de préparations microscopiques de gonades récoltées dans les baies de Falmouth et de Veryan.

Les auteurs anglo-saxons apprécient les séquences de l'évolution sexuelle de *Pecten maximus* en se référant aux stades macroscopiques de la gonade décrits par Mason (1958). Nous avions également établi une échelle des stades de maturation de la gonade des bivalves (Lubet, 1959). Une étude

comparative, portant sur environ 500 individus, a permis d'établir les équivalences suivantes, plusieurs stades de Mason recouvrant la même étape du développement sexuel:

| | Animaux juvéniles | | | Animaux adultes | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Développement de la gonade | | | Maturité | Ponte | Restauration |
| **Mason** | **0** | **I** | **II** | **VI** | **VII** | **III IV V** |
| **Lubet** | **0** | **I** | **II** | **III A** | **III B** | **III C** |

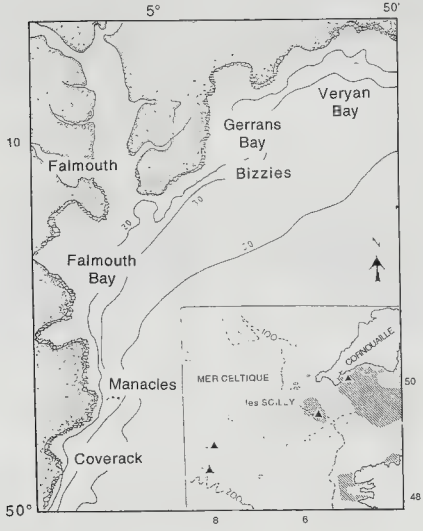



Figure 1. Localisation des stations prospectées sur les côtes du Royaume Uni (Cornouaille: Baie de Falmouth ) et sur le plateau continental (Mer Celtique ).

## RESULTATS

### *Index gonadique*

En 1990-91, les variations du GI 3 présentent la même allure générale sur les côtes de Cornouaille et en baie de Seine. Tous les animaux étudiés provenaient de stations comprises entre 10 et 40 m de profondeur ; ils mesuraient entre 9 et 10 cm de hauteur. Les valeurs les plus faibles ont été observées en automne, les plus fortes à la fin du printemps et en été. Toutefois la valeur de l'index

gonadique est toujours plus élevée chez les populations de la baie de Seine que chez celles du sud-ouest de l'Angleterre. (Fig. 2 A). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en 1985-86 dans la baie de Falmouth pour deux stations (Bizzies et Veryan) à des profondeurs et pour des tailles identiques (Fig. 2 B).

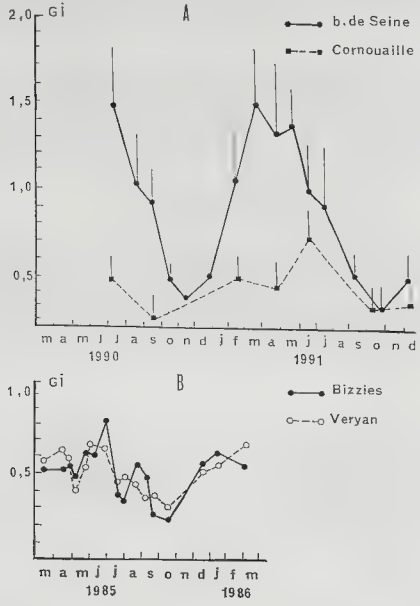



Figure 2 A. Variations en 1990-91 de l'index gonadique (GI 3) des populations de Coquilles St. Jacques de la baie de Seine et la baie de Falmouth (Cornouaille) (échantillons de 9-10 cm de hauteur prélevés entre 10 et 40 m de profondeur). Les barres verticales représentent le demi écart-type
B. Variations en 1985 86 de l'index gonadique de populations de Coquilles St Jacques de la baie de Falmouth (Cornouaille) prélevées en deux stations (Bizzies et Veryan) à des profondeurs de 30 à 40 m. L'étude des écarts types a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les deux courbes (d après Dare, 1992).

*Histologie*

L'étude histologique montre la présence dans tous les échantillons étudiés en 1985-86 et 1990-91, en proportion variable suivant les saisons, de stades de maturité sexuelle (IIIA), d'émission des gamètes (IIIB) et de restauration de la gonade (IIIC), ce qui suggère l'existence d'un cycle sexuel pratiquement continu. (Fig. 3). Comme il a été établi pour les populations de la baie de Seine (Lubet et al, 1991), il n'existe pas de synchronisme du développement sexuel au sein d'une même population mais des tendances globales décelables statistiquement pendant certaines périodes de l année (émission des gamètes, restauration de la gonade, atrésie et lyse des ovocytes...). Chez un même individu, plusieurs cohortes d'ovocytes évoluent successivement au cours de l'année et il existe un asynchronisme au sein de la gonade, sauf après une ponte totale Ce dernier se traduit par l'existence de zones possédant des ovocytes en maturation, d'autres des ovocytes matures ou atrétiques et en cours de lyse, alors que d'autres régions de la gonade sont en voie de restauration Cet asynchronisme est vraisemblablement responsable des pontes partielles, il a été observé chez tous les animaux étudiés, quelle que soit la station et la profondeur ainsi qu une atrésie constante affectant de 20 à40% de la population des ovocytes.

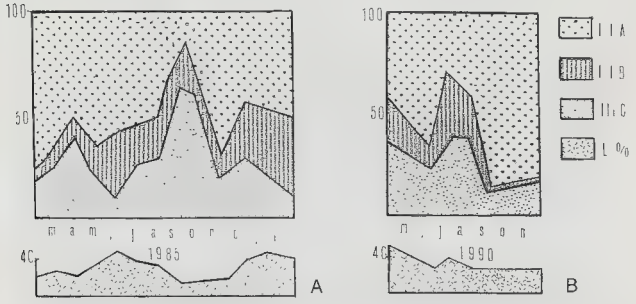



Figure 3. A: Stades sexuels en 1985-86 des populations de Coquilles St. Jacques de la Baie de Veryan (Cornouaille). B Stades sexuels en 1990-91 des populations de Coquilles St Jacques de la Baie de Falmouth (Cornouaille). Stades IIIA. Maturité sexuelle, réplétion de la gonade avant l émission des gamètes, III B: vidange après la ponte et spermation, IIIC: restauration de la gonade Les valeurs en ordonnée expriment le pourcentage mensuel de ces stades dans la population, L% le pourcentage d ovocytes atrétiques ou en cours de lyse dans la population totale d'ovocytes.

*Pontes*

Les animaux effectuent vraisemblablement plusieurs pontes au cours du cycle sexuel annuel, du printemps au début de l'automne, qui varient d'une année à l'autre (Dare, 1987). Les valeurs assez faibles de l'index gonadique comme l'existence permanente de l atrésie et lyse ovocytaire sont vraisemblablement responsables d'une fécondité moins élevée qu'en baie de Seine (Dare, 1992). Toutefois, l'étalement des pontes comme les facteurs hydrologiques locaux (faibles écarts thermiques saisonniers: 7-8° C, apports nutritionnels réguliers) constituent des conditions favorables au recrutement et à la restauration de la pêcherie.

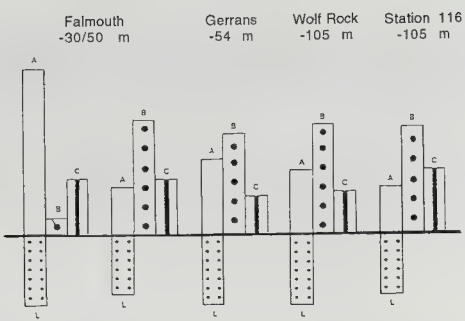



Figure 4. Stades sexuels observés en juillet 1990 dans deux populations de Coquilles St. Jacques de la baie de Falmouth (Cornouaille). Falmouth: 02 07 90 et 11 07 90 et Gerrans 05 07 90 et deux populations de la mer Celtique (Wolf Rock 11.07.90 et Station 116. 13.7.90). Les deux prelèvements effectuée à Falmouth montrent qu'une ponte s'est produite entre le 2 et le 11 juillet. A: stade IIIA, B: stade IIIB, C: stade IIIC, L: Lyse.

L'examen en juillet 1990, à des dates très rapprochées, d'animaux provenant des stations échelonnées entre -30 m et -135 m et couvrant un vaste secteur géographique, a montré qu'il existait peu de différences au niveau de l'évolution sexuelle, avec une forte proportion d'individus ayant pondu et en voie de restauration (Fig. 4). La ponte se situerait pendant le début du mois de juillet; elle serait légèrement plus précoce dans les stations les plus superficielles.

***Index musculaire***

Bien que l'échantillonage ait été assez irrégulier en 1990-91, l'ensemble des résultats obtenus pour les stations comprises entre -35 et -55 m montre un accroissement du MI du printemps à l'automne comparable à ce que l'on observe pendant le même période en baie de Seine et avec des valeurs du même ordre (Fig. 5).

## DISCUSSION. COMPARAISON AVEC DIFFERENTS SECTEURS DE L'AIRE DE REPARTITION

Les populations des côtes de Cornouaille présentent un cycle sexuel continu avec de faibles variations du GI et plusieurs pontes étalées dans l'année de la fin de l'hiver à l'automne. Cette stratégie se retrouve dans les zones soumises à de fortes influences atlantiques: côtes nord-ouest et sud-ouest des Iles Britanniques (Ecosse et Irlande : Mason 1983, Dare, 1992) ainsi que chez les populations de la rade de Brest (Paulet *et al.* 1988) et même de la façade atlantique de l'Espagne (Galice. Pazos *et al*, 1995). Toutefois les valeurs du MI sont plus élévées chez les populations de Cornouaille que dans celles de la Bretagne occidentale, ce qui pourrait être l'indice d'une meilleure nutrition, le muscle constituant un organe de réserve énergétique (Faveris et Lubet, 1991). Enfin la longue saison de ponte comme l'existence de conditions hydrologiques stables (T: 6-16°C, S: 34.5 à 35.5 ‰, forte productivité) permettraient un recrutement régulier.

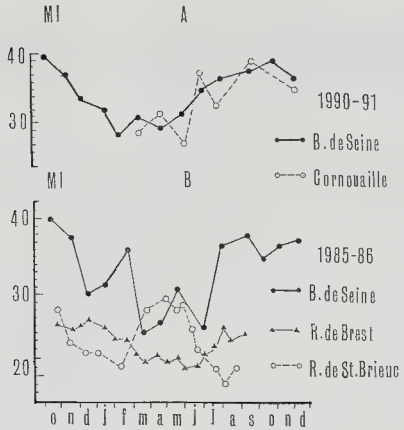



Figure 5. A: Variations en 1990-91 de l'index musculaire (MI2) des populations de Coquilles St. Jacques de la baie de Falmouth (Cornouaille) et de la baie de Seine B: Variations en 1985-86 de l'index musculaire (MI2) de la baie de Seine, de la rade de Brest et de la baie de St.Brieuc (d'après Lubet *et al*, 1995).

Les populations de Manche orientale : baie de Seine (Lubet *et al.*, 1991; Lubet, 1992), Devon (Dare, 1992) sont également caractérisées par un cycle sexuel continu, bien que certaines années il ait été observé en octobre un bref arrêt sexuel. Le suivi du GI en baie de Seine, de 1982 à 1992, a montré une grande homogénéité des résultats. Les variations sont beaucoup plus fortes qu'en Cornouaille (Fig. 2), les minima étant observés au début de l'automne, les maxima du printemps au début de l'été. On constate toujours une assez forte variabilité au sein de la population (écarts types élevés). La période de ponte a varié en fonction des conditions climatiques. Elle est plus longue, allant de mai à fin novembre, lorsque les écarts thermiques saisonniers sont faibles (hivers et printemps doux). Elle est plus brève avec une ponte principale en juillet et quelques pontes asynchrones en août et septembre lorsque les écarts sont importants (hivers et printemps froids, étés chauds). Cette dernière stratégie rappelle celle observée par Strand et Nylund (1991) pour les populations des fjords de Norvège. En baie de Seine, les facteurs du milieu beaucoup moins tamponnés que dans les stations atlantiques avec de brusques variations thermiques et des périodes de sécheresse réduisant les apports telluriques influant fortement sur la productivité primaire, ont une incidence importante sur le recrutement qui est meilleur lorsque la saison de ponte est étalée (Lubet, 1992). Il faut donc mettre en oeuvre une gestion attentive de la pêcherie pour préserver le stock, en assurant *la protection d'au moins une des classes d'âge soutenant le recrutement.* L'étude des variations du MI est particulièrement instructive révélant des variations en sens opposé à celles du GI, ce qui traduit bien le rôle de ce muscle dans la fourniture de l'énergie couvrant l'effort de reproduction (Faveris & Lubet, 1991).

Les populations des côtes françaises de la Manche occidentale: baie de St Brieuc (Paulet *et al.*, 1988; Paulet et Fifas, 1989; Lubet *et al*, 1995) et du golfe Normano-Breton (Lubet, 1992) présentent une stratégie de reproduction qui les différencie nettement de toutes les autres populations connues de *Pecten maximus*.. Il existe ici une longue période de repos sexuel automnal et hivernal (minimum du GI), une reprise de l'activité sexuelle à la fin de l'hiver et une période de maturité sexuelle fin juin (maxima du GI) conduisant à de fortes pontes en juillet et peut être à des émissions partielles en août.

La saison de reproduction très courte, de quelques jours à quelques semaines, est fortement dépendante des facteurs du milieu, instables dans cette zone très littorale, ce qui entraine un recrutement de type aléatoire impliquant aussi une gestion vigilante du stock. L'étude du MI (Paulet *et al.*, 1988) montre aussi un comportement particulier, les variations du MI étant synchrones de celles du GI ce qui est le contraire de ce qui se passe dans les autres stations (Fig. 5). La restauration de l'énergie du muscle s'effectue en même temps que la maturation de la gonade grâce à la productivité phytoplanctonique printannière mais ces réserves doivent couvrir l'effort de reproduction et la croissance La question se pose alors de savoir pourquoi ces populations ont un comportement sexuel plus proche d'autres Pectinidés comme *Chlamys varia*, que de celui des *Pecten maximus* des autres secteurs de l'aire géographique de l'espèce Des recherches entreprises sur l'étude du polymorphisme enzymatique ont montré qu'il existe des différences entre les stocks mais que celles-ci restent faibles et que les populations génétiquement les plus proches de la baie de St. Brieuc sont celles de la baie de Seine et non celles de la rade de Brest. (Huelvan, 1985) L'étude de l'ADN mitochondrial effectuée par Riga *et al* (1993 )n a pas donné jusqu'ici de résultats permettant d'identifier les stocks mais révèle un haut degré individuel de polymorphisme. Les recherches récentes sur les courants de la Manche (Salomon & Breton, 1991) rendent peu probable la possibilité d'échanges de larves avec des populations adjacentes, car cette région de la Manche occidentale est enfermée dans un vaste vortex qui réduit les apports d'eaux du large. L'isolement écologique des populations de la baie de St. Brieuc et du golfe Normano-Breton pourrait avoir permis la sélection de génotypes à cycle sexuel court en éliminant les hétérozygotes (Effet Walhund, Rios *et al* , 1995). En effet les conditions nutritionnelles locales (eaux à faible productivité comme le montre les index de qualité relativement peu élevés des autres bivalves comparés à ceux de Manche orientale) ne permettraient pas d'accumuler les réserves énergétiques suffisantes pour assumer la compétition entre reproduction et croissance. En faveur de l'hypothèse d'une population ayant évolué de façon endémique, des expériences de transplantation de juvéniles de *P. maximus*, de la rade de Brest en baie de St. Brieuc ont montré que ces animaux gardaient, dans leur nouvelle implantation, les séquences du cycle de reproduction de leur milieu d'origine. Mais les valeurs du GI des animaux transplantés étaient moindres que ceux de la rade de Brest ce qui indique des conditions nutritionnelles moins favorables (Buestel *et al.*, 1987; Ansell *et al.*, 1988). L'étude des variations du MI strictement liée à celle de la productivité primaire permet aussi de penser que la sélection a pu être modulée par l'impossibilité d'assurer un cycle sexuel continu compétitif avec la croissance La stratégie de reproduction de ces stocks pourrait être la conséquence de l'action de facteurs génétiques et (ou) d'une réponse aux facteurs de l'environnement (Lubet *et al.*, 1995).

Dans beaucoup de stations de la Manche, il existe souvent fin juin et début juillet, des pontes importantes que l'on retrouve assez régulièrement d'une année à l'autre, dans des populations différentes. (Paulet *et al* 1988 ; Lubet, 1992). Les recherches effectuées en Cornouaille en 1990 ont montré, dans un vaste secteur géographique et pour des stations échelonnées entre -35 et -135 m, un synchronisme des pontes de juillet Il peut s'agir d'un hasard et des suivis sur plusieurs années seraient indispensables Toutefois, cette observation appelle les commentaires suivants concernant les stations de Cornouaille Pour expliquer ce synchronisme on ne peut invoquer ni l'influence de la photopériode car les animaux des stations profondes ne reçoivent pas suffisament de lumière pour que ce stimulus puisse agir, ni celle de la température car les relevés thermiques au niveau des stations inférieures à -100 m montrent peu de différence entre l'hiver (9°C) et l'été (10-11°C) Enfin la salinité reste constante. Il est possible de penser, comme l'ont montré Starr *et al.* (1990) que des

substances contenues ou émises par le phytoplancton, agissant seules ou en synergie avec d'autres stress, puissent induire la ponte ou la spermiation. Dans ces conditions, l'abondance du phytoplancton au moment des émissions des gamètes permettrait une bonne évolution des larves et favoriserait le recrutement. Cette hypothèse expliquerait la fréquence des pontes de juillet compte tenu de la diversité des situations au niveau des stations (Cornouaille 1985, 1990, St Brieuc en général, Baie de Seine). Des conclusions identiques ont été formulées par Couturier (1994) pour expliquer le synchronisme des pontes dans des populations de *Placopecten magellanicus* de l'est canadien.

## TRAVAUX CITÉS


Ansell A D , Dao J C , Lucas A , Mackie L A & Morvan C., 1988 Reproduction and genetic adaptation in natural and transplant population of the scallop, *Pecten maximus*, in European waters. *International Cooperation Committee. Scientific Cooperation, Contract* : ST-0058. 1-VK-CR: 1-50.

Buestel D , Gerard A & Guenolé, 1987 Croissance de différents lots de Coquilles St Jacques, *Pecten maximus*, en culture sur le fond de la rade de Brest, *Haliotis*, **16:** 463-477.

Couturier C., 1994. Spawning in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. In *9th International Pectinid Workshop*, 22-27. 05 97 Nanaimo BC, Canada (N F Bourne, B L Bunting & L D Townsend, eds ) *Canadian Technical Reports Fisheries and Aquaculture Sciences*, **1:** 138-146

Dare P. J., 1987 Settlement of the scallop, *Pecten maximus* L. spat on natural substrates off S W England the hydroid connection. *6 th. International Pectinid Workshop, Menai Bridge (U. K.)* : 1-8. (mimeo)

Dare P. J , 1992 Spawning cycles, maturation and fecundity of scallops *Pecten maximus L.* in the English Channel *Directory Fisheries Research, Lowestoft*: : 1-13 (mimeo).

Faveris R. & Lubet P., 1991 Energetic requirements of the reproductive cycle in the scallop *Pecten maximus L.* in the baie de Seine. *Aquaculture Workshop (The World Aquaculture Society)*, 1: 67-73.

Huelvan S , 1985 Variabilité génetique des populations de *Pecten maximus L.* en Bretagne *These 3ème Cycle, Université de Bretagne occidentale, Brest* : 1-158.

Lubet P , 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gametes chez les Mytilides et les Pectinides *Revue des Travaux de l'Institut scientifique et technique des Pêches maritimes, Paris*, **23** (4):396-545.

Lubet P , 1986 The reproductive strategies of Bivalve Molluscs *Advances in Invertebrate Reproduction (Porchet, Andries & Dhainault Eds. )*, Elsevier: 401-408

Lubet P., 1992. Etude des mécanismes contrôlant la croissance et la reproduction chez les mollusques d interêt commercial *Fonds Régional de Recherche et de Développement, Region de Basse Normandie* 1-21 (mimeo )

Lubet P , Faveris, R , Besnard, J Y , Robbins I & Duval P , 1991 Reproduction of *Pecten maximus* L. from the baie de Seine. *World Aquaculture Workshop (The World Aquaculture Society )*, 1 : 87-94.

Lubet P , Devauchelle, N , Muzellec, M L , Paulet Y M , Faveris R & Dao J C , 1995 Reproduction of *Pecten maximus* from different areas rade de Brest, baie de St. Brieuc, baie de Seine *Actes Colloques IFREMER*, 17 157-163

Mason J , 1958 The breeding of *Pecten maximus L.* in Manx waters *Journal of the Marine Biological Association United Kingdom*, **37:** 653-671.

Mason J , 1983 Scallop and queen scallop fisheries in the British Isles. *Buckland Foundation New Books* 142 p

Paulet Y M., Lucas A & Gerard A , 1988. Reproduction and larval development in two *Pecten maximus L.* population from Brittany. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, **19:** 145-156.

Paulet Y M , Fifas S 1989 Etude de la fécondité potentielle de la Coquille St Jacques en baie de St. Brieuc *Haliotis*, **19:** 275-285

Pazos A J , Roman G , Acosta C P , Abad M & Sanchez J L , 1996 Stereological studies on the gametogenic cycle of the scallop*Pecten maximus* in suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N. W Spain) *Aquaculture*, **142** 119-135.

Rigaa A., J , LeGall Y , Sellos D , & Monnerot M , 1993 Mitochondrial DNA polymorphism in the scallop *Pecten maximus*. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*, **2:** 218-224.

Rios G., Mestre E., Canales J. & Pena J B , 1995 Genetic basis underlying spawning asychronicity in a wild population of mediterranean scallop *Pecten jacobaeus* L. *10 th International Pectinid Workshop, Cork, Ireland* : 111-112.

Salomon J C. & Breton M , 1991. Courants résiduels de maree dans la Manche *Oceanologia Acta*, 11 47-53

Starr M., Himmelman J H & Therriault J C , 1990 Direct coupling of marine invertebrate spawning with phytoplancton blooms. *Science*, 247 : 1071- 1074.

Strand O & Nylund A , 1991 The reproductive cycle of the scallop *Pecten maximus* (L 1758) from two populations in western Norway (60°N to 64°N) *World Aquaculture Workshop (The World Aquaculture Society )*, 1: 95-101.

# La reproduction chez un Mollusque hermaphrodite simultané, la planorbe *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastéropode, Pulmoné)

*Marc VIANEY-LIAUD*[1]

RÉSUMÉ

Cet article fait le point sur nos connaissances et nos lacunes concernant la reproduction de la planorbe *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).

*B. glabrata*, apres une courte période d'activite mâle, montre un hermaphrodisme simultané. Les deux gamétogenèses, mâle et femelle, ont lieu simultanément au sein de chaque acinus de l'ovotestis. L'autodifférenciation des gonocytes femelles, bien que probable, n'a pu être expérimentalement démontrée. Les tractus génitaux montrent un fonctionnement largement indépendant de l'ovotestis, la castration post-pubérale entraînant le dépôt de pontes dépourvues d'embryon. La castration pré-pubérale peut être suivie d'une régénération de la gonade et du dépôt de pontes fertiles.

Les *B. glabrata* isolées se reproduisent par autofécondation, la rencontre des gamètes ayant lieu dans la vésicule séminale. Dans la plupart des autres situations réunissant deux ou plusieurs individus, il y a accouplement(s). En général, une planorbe se comporte comme mâle, l'autre comme femelle. Des accouplements simultanés comme mâle et comme femelle avec deux partenaires différentes ont été décrits. Le double accouplement réciproque a été observé dans environ 5 % des cas.

Après insémination d'une planorbe femelle (rencontre des spermatozoïdes étrangers et des ovocytes dans l'ovotestis), cette dernière utilise progressivement l'allosperme reçu et produit, pendant parfois plusieurs mois, des pontes contenant une proportion progressivement décroissante d'embryons issus d'allofécondation. Après épuisement de l'allosperme, l'autofécondation redevient l'unique mode de fécondation. Le passage de l'allofécondation à l'autofécondation entraîne une diminution de la fécondité d'environ 40 %.

La castration chirurgicale post-pubérale n'empêche pas les planorbes de s'accoupler. Si elles s'accouplent comme mâle, elle peuvent inséminer une partenaire et passent ainsi du statut d'hermaphrodite fonctionnel à celui de mâle fonctionnel temporaire.

Le jeûne alimentaire et la dessiccation réduisent ou suspendent temporairement l'utilisation de l'allosperme. Cependant, après retour de conditions normales, l'allofécondation redevient le mode de fécondation privilégié.

L'utilisation de l'albinisme comme marqueur génétique a permis d'analyser les modes de fécondation consécutifs à divers dispositifs expérimentaux (durée de l'appariement, réunion d'une planorbe avec des nombres variables de partenaires, appariements d'une planorbe avec des partenaires successives). Avec les souches homozygotes sélectionnées au laboratoire, lors d'inséminations d'une planorbe albinos par des

[1] Laboratoire Génétique et Environnement, Institut des Sciences de l'Evolution, UMR-CNRS 5554, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier (France).

partenaires albinos et pigmentées, il y a utilisation préférentielle des spermatozoïdes produits par les pigmentées. Cette compétition spermique a été confirmée chez des hétérozygotes, en auto- et en allofécondation. En dépit d'une forte variabilité, les spermatozoïdes produits par les pigmentées ont une longueur moyenne significativement supérieure à celle de spermatozoïdes produits par les albinos. Dans les deux souches homozygotes, une forte proportion de spermatozoïdes sont a- ou oligo-pyrènes. La distinction dans une descendance entre embryons issus de plusieurs pères potentiels ne pourra se faire avec la seule utilisation de l'albinisme mais devra combiner plusieurs méthodes, en faisant appel en particulier à la biologie moléculaire et au marquage des spermatozoïdes par la radioactivité. Des résultats expérimentaux récents viennent contredire, une fois de plus, l'hypothèse maintenant peu vraisemblable du "partage du sperme" chez *B. glabrata*.

Les stades larvaires de Trématodes, selon les espèces, réduisent ou bloquent la reproduction de leur hôte. Ce blocage peut se faire en agissant au niveau du système nerveux, tout en préservant largement l'intégrité de l'appareil génital.

## ABSTRACT

**Reproduction in a simultaneous hermaphroditic freshwater Mollusc, the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastropoda: Pulmonata).**

This paper is a synthesis of our present knowledge of reproduction in the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).

After a short protandric period, *B. glabrata* shows a simultaneous hermaphroditism throughout its life-cycle. Male and female gamatogeneses occur simultaneously in every acinus of the hermaphroditic gonad (ovotestis). Self differentiation of female gonocytes is likely but has not been experimentally proved. The physiology of the reproductive tracts is widely independent of the ovotestis, post-puberal surgical castration being followed by the deposition of egg-masses devoid of embryos. Pre-puberal castration may be followed by a regeneration of the gonad and production of fertile egg-masses.

Isolated *B. glabrata* reproduce by self-fertilization which occurs in the seminal vesicle. In most other situations where two or several individuals are brought together, there is cross-fertilization. Generally, a snail acts as a male, its partner as a female. Simultaneous copulations as male and female with two different partners sometimes occur. Double reciprocal simultaneous copulation has been observed in approximately 5 % of cases.

After insemination of a female acting snail, with the meeting of oocytes and foreign sperm in the ovotestis, the latter progressively uses the allosperm received and produces egg masses which contain a progressively decreasing number of cross-fertilized embryos. When the allosperm is exhausted, sometimes after several months, self fertilization again becomes the only mode of reproduction. From cross- to self-fertilization, fecundity decreases by approximately 40 %.

Post puberal surgical castration does not prevent copulation. If they copulate as males, they may fertilize a partner and so become temporary functional males.

Starvation and desiccation reduce or temporarily suspend the use of allosperm. After return to normal conditions/cross-fertilization again becomes the essential mode of reproduction.

The use of albinism as a genetic marker allows the analysis of modes of fertilization in various experimental situations (length of pairing, mating of a snail with varying numbers of partners, pairings of one snail with successive partners). For homozygous strains selected in the lab, if an albino *B. glabrata* copulates with pigmented and albino partners, it preferentially uses sperm produced by the pigmented partner. This sperm competition has been also observed for cross- or self-fertilization in heterozygous snails. Despite a high variability, sperms produced by pigmented snails have a significantly longer mean length than sperms from albinos. In homozygous pigmented and albino individuals, a high proportion of sperm is a- or oligo-pyrene.

Using albinism as the only genetic marker, it is not possible to distinguish embryos which are the issue of several possible fathers; it will be necessary to combine several methods, for example molecular markers or labelled sperms. Recent experimental results, are inconsistent with the hypothesis, now very unlikely, of sperm sharing in *B. glabrata*.

Larval stages of trematodes reduce or completely inhibit the reproduction of their planorbid host. The parasites may act on the central nervous system yet still allow the maintainance of the morphological integrity of the reproductive system.

## INTRODUCTION

La connaissance de la biologie des centaines de milliers, voire des millions d'espèces animales aujourd'hui recensées, demeure peu probable, même à long terme. Les techniques se perfectionnent sans cesse. Il est cependant frappant de constater que les progrès techniques permettent souvent d'améliorer la connaissance des mêmes espèces, celles précisement dont on ignorait déjà le moins.

Chez les Pulmonés Basommatophores, les deux espèces qui reviennent le plus souvent sous la plume des chercheurs sont *Lymnaea stagnalis* et *Biomphalaria glabrata*.

L'abondance de la documentation dont on dispose aujourd'hui sur *L. stagnalis* peut surprendre. Il ne s'agit pas d'une espèce comestible; son rôle d'hôte intermédiaire de Trématodes est indiscutable mais n'intéresse pas directement la santé humaine. C'est en fait une grosse Limnée *a priori* guère plus intéressante que les autres espèces du même genre. Le mérite n'en est que plus grand pour ceux qui ont su y voir un matériel de laboratoire exceptionnel qui a constitué, et constitue encore, un remarquable modèle en neurobiologie (il en est de même chez les Opisthobranches avec le genre *Aplysia*). Au risque d'en mécontenter beaucoup dont le rôle n'est pas mince, je signalerai seulement l'ampleur des travaux réalisés par l'équipe du laboratoire de biologie de la Vrije Universiteit d'Amsterdam (Pays-Bas).

L'énormité (quantitative) des études ou il est fait référence à *Biomphalaria glabrata* est plus facile à interpréter. *B. glabrata* montre une large répartition géographique sur le continent américain *s.l.* et, de plus, cette espèce est élevée dans de nombreux laboratoires, dans le monde entier. Il est évident que c'est surtout par ses rapports avec un sérieux problème de parasitologie humaine que *B. glabrata* est connu (Doumenge *et al.*, 1987). *Biomphalaria glabrata* - bilharziose (= schistosomiase) - *Schistosoma mansoni* ; il est probablement aujourd'hui impossible de répertorier, mais surtout de prendre connaissance, de toutes les informations acquises sur ce trio toujours d'actualité, au succès scientifique jamais démenti malgré le temps qui passe et les publications qui s'accumulent. Même si le problème n'est pas limité à *B. glabrata*, plus de 10000 références relatives à la bilharziose sont répertoriées dès 1962 (Warren et Newill, 1967, cité par Berrie, 1970).

Chez une telle espèce, qui fait l'objet de tant d'études, il serait logique qu'une analyse biologique complète ait été réalisée depuis longtemps et que nos connaissances ne progressent plus que par la mise en oeuvre de nouvelles techniques. Il n'en est pourtant rien et bien des points qui restent encore dans l'ombre peuvent être progressivement éclaircis à l'aide de méthodes simples, aisément utilisables depuis longtemps. Les informations dont on dispose cependant aujourd'hui sont dispersées dans de très nombreux articles. La présente publication se propose, sous forme relativement réduite, de faire le point sur nos connaissances, mais aussi sur nos lacunes, concernant un aspect particulier de sa biologie: la reproduction.

Afin de lever toute ambiguïté, je rappelle que la dénomination générique de l'espèce étudiée ici, *Biomphalaria glabrata*, fut l'objet d'une discussion (Paraense, 1958, 1961b; Baker, 1960; Barbosa *et al.*, 1961) finalement tranchée par l'opinion n°735 de la Commission Internationale de Nomenclature Zoologique (1965). *B. glabrata*, *Australorbis glabratus*, *Taphius glabratus* et *Planorbina glabrata* sont une seule et même espèce.

## ORGANISATION DE L'APPAREIL GÉNITAL

Le fonctionnement de l'appareil génital et les modalités de la reproduction sont bien sûr intimement liés à sa structure; il convient donc de rappeler au préalable les grandes lignes de son organisation (Figure 1).

Comme chez toutes les familles évoluées (Lymnaeidae, Physidae, Ancyloplanorbidae) (Hubendick, 1978), l'appareil génital comporte trois parties:

- une portion proximale comprend la gonade (= ovotestis) et le canal hermaphrodite *s.l.* (vésicules séminales comprises). Cette portion est morphologiquement et fonctionnellement hermaphrodite,

- à partir de la région dite du "carrefour", deux voies, parallèles sur une grande partie de leur longueur mais complètement indépendantes, s'étendent distalement, la voie mâle et la voie femelle, chacune s'ouvrant par un orifice génital situé en arrière du tentacule gauche (les planorbes montrent un enroulement senestre). Le pore mâle est antérieur au pore femelle.

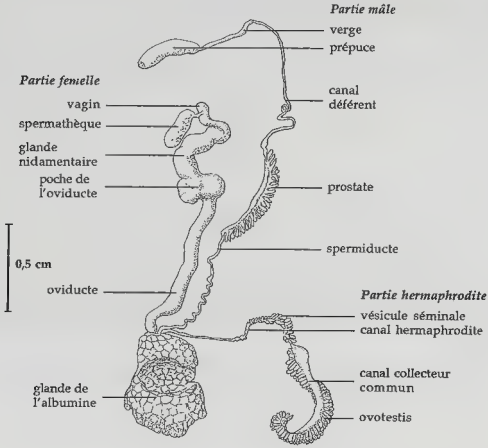



Figure 1. Organisation de l'appareil génital de *Biomphalaria glabrata*.

Sans que cela retentisse sur la compréhension générale des structures concernées (les auteurs s'accordent finalement largement sur l'anatomie de l'appareil génital), la terminologie varie cependant d'une publication à l'autre. A titre d'exemple, le tableau 1 montre la diversité de la nomenclature utilisée par divers auteurs.

L'extrapolation des résultats acquis chez *Biomphalaria straminaea* et six autres espèces de Basommatophores, permet de penser que l'origine de la gonade est mésodermique et celle des tractus génitaux ectodermique (Brisson et Regondaud, 1971, 1977).

Il est évident que la simple étude de la morphologie de l'appareil génital laisse prévoir, à juste titre, que *B. glabrata* peut se reproduire, après accouplement, par fécondation croisée. On verra également que l'anatomie de la gonade et des tractus génitaux est compatible avec une reproduction par autofécondation, en particulier chez les animaux qui, isolés dès l'éclosion, atteignent la maturité sexuelle et déposent alors des pontes fertiles.

Tableau 1: Différentes dénominations des organes composant l'appareil génital chez *Biomphalaria glabrata*.

| Paraense et Deslandes (1955b) | Pan (1958) | de Jong-Brink (1969) | Paraense (1976) | Jung (1992) |
|---|---|---|---|---|
| | | *Partie hermaphrodite* | | |
| ovotestis | ovotestis | ovotestis | ovotestis | ovotestis |
| seminal vesicle | seminal vesicle | seminal vesicle | seminal vesicle | seminal vesicle |
| ovisperm duct | ovispermduct | hermaphroditic duct | ovispermduct | ovisperm duct |
| | | *Partie mâle* | | |
| sperm duct | spermduct | spermduct | spermiduct | sperm duct |
| prostate | prostatic gland | prostate gland | prostate | prostate gland |
| vas deferens | vas deferens | vas deferens | vas deferens | vas deferens |
| vergic sac | vergic sac | verge | penial sheath | penial sheath |
| preputium | praeputium | praeputium | prepuce | preputium |
| | | *Partie femelle* | | |
| | albumen gland | albumen gland | albumen gland | albumen gland |
| oviduct | oviduct | oviduct | oviduct | oviduct |
| pouch of the oviduct | | muciparous gland | pouch of the oviduct | |
| | nidamental gland | oöthecal gland | nidamental gland | nidamental gland |
| uterus | uterus | uterus | uterus | |
| vaginal pouch | | | | vagina pouch |
| vagina | vagina | vagina | vagina | vagina |
| spermatheca | spermatheca | bursa copulatrix | spermatheca | spermatheca |

## LA GONADE

### *Morphologie*

Comme chez tous les Pulmonés (Duncan, 1975), la gonade présente une structure acineuse. Les acini, de diamètre constant, sont rangés sensiblement parallèlement les uns aux autres. L'extrémité proximale d'un acinus est marquée par un cul-de-sac arrondi, tandis que l'extrémité distale s'ouvre dans un canal qui parcourt la gonade sur toute sa longueur, le canal collecteur commun (Figure 2).

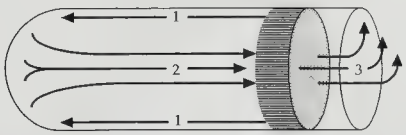



Figure 2. Représentation schématique d'un acinus de l'ovotestis chez *B. glabrata*. Les cellules sexuelles mâles et femelles se différencient au sein de l'anneau d'épithélium germinatif (zone grisée) situé vers le col de l'acinus puis migrent (1) vers le cul-de-sac, accolées à la paroi; les stades terminaux des deux gamétogenèses se détachent de la paroi, tombent dans la lumière (2) et sont évacués (3) vers le canal collecteur commun.

Distalement, sur 1/4 à 1/3 de sa longueur, la gonade est bordée par la glande digestive. A l'inverse, dans la partie proximale de la masse viscérale, il ne subsiste plus que la gonade, emballée dans une mince couche de conjonctif, le tout limité par l'épithélium tégumentaire. On verra plus loin que cette particularité anatomique des planorbes a permis la réalisation d'explantations *in vitro*.

En direction distale, le canal collecteur fait place à un conduit de fort diamètre, le plus souvent vide, puis à un court canal en forme d'anse double ( 'S"-shaped tube, Pan, 1958) qui débouche dans les vésicules séminales. Ces deux structures, au sein desquelles ne se forme aucune cellule sexuelle, seront traversées par les spermatozoïdes et les ovocytes et peuvent être considérées comme la partie proximale du canal hermaphrodite s.l. (sa partie distale s'étendant dans cette hypothèse des vésicules séminales au carrefour). Anatomiquement, il s'agit effectivement des éléments tout à fait proximaux des tractus génitaux; cependant, on verra, à propos des expériences de gonadectomie, qu'il s'agit en fait d'un prolongement potentiel de la gonade

*Anatomie microscopique*

Les premières données en microscopie photonique chez les planorbes sont dues à Merton (1930) qui étudia trois espèces: *Planorbis planorbis*, *P carinatus* et *Planorbarius corneus*. Après les travaux d Abdel-Malek (1954a, 1954b) chez *Helisoma trivolvis* et *B boissyi*, Pan (1958) publia une description histologique, incluant tout l appareil génital, chez *B. glabrata*. Chez cette dernière espèce, Barth et Jansen décrivirent les cellules nourricières (1959), la spermiogenèse (1960) et plus particulièrement l évolution de l'appareil de Golgi (1961) ainsi que l'ovogenèse (1962).

Peu d'espèces de planorbe ont été l'objet d'études histochimiques ou en microscopie électronique. Chez *P corneus*, divers aspects de l'ovogenèse ont été étudiés par Favard et Carasso (1958), Albanese et Bolognari (1961, 1964), Bottke et Tiedtke (1988) tandis que Starke (1971) publia une description générale de la gonade.

Chez *B. glabrata*, on a disposé d abord d'études partielles relatives aux cellules sexuelles mâles. spermatides (Bogitsh, 1974a), flagelle du spermatozoïde (Barth et Oliveira Filho, 1964), pièce intermédiaire du spermatozoïde (Bogitsh, 1974b), mitochondries du spermatozoïde (Bogitsh, 1975). La description ultrastructurale complète du spermatozoïde mûr sera réalisée par Kitajima et Paraense (1976). L étude statistique de la longueur des spermatozoïdes a été effectuée chez des souches homozygotes pigmentées et albinos; les résultats en seront vus dans le chapitre concernant les échanges génétiques (Vianey-Liaud *et al.*, 1996). La coloration au DAPI suivie de l'observation en fluorescence révèle l'existence d'un pourcentage important, proche de 50 %, de spermatozoïdes oligo- ou a-pyrènes (Vianey-Liaud, *et al.*, 1996). Deux très importantes études seront consacrées à l'ovogenèse et aux cellules folliculeuses (de Jong-Brink *et al.*, 1976) puis à la spermatogenèse et aux cellules de Sertoli (de Jong-Brink *et al.*, 1977). L'ultrastructure des contacts entre cellules de Sertoli a été étudiée par Anelli *et al.* (1985).

Tous les auteurs s'accordent en fait pour considérer que l ovotestis renferme quatre catégories cellulaires:
- les cellules sexuelles mâles,
- les cellules sexuelles femelles,
- les cellules nourricières (= cellules de Sertoli),
- les cellules folliculeuses.

Pour ces deux dernières catégories, la terminologie prête parfois à confusion. Barth et Jansen (1959) regroupent cellules de Sertoli et cellules folliculeuses en utilisant le terme de "célula nutridora" (– cellules nourricières) alors qu en français, depuis Ancel (1903), ce terme ne désigne que les cellules sur lesquelles s'implantent les cellules sexuelles mâles. Starke (1971) regroupe également sous un seul terme les 'Begleitzellen" (= cellules accompagnantes) parmi lesquelles il distingue néanmoins cellules folliculeuses et cellules de Sertoli. En désignant par quatre vocables différents les quatre catégories de cellules, de Jong-Brink *et al* (1976, 1977) renouent avec une terminologie claire qui avait été utilisée avec raison dès le début du siècle.

Chez *B. glabrata*, mais le schéma semble assez général chez les Basommatophores, les cellules sexuelles mâles et femelles se différencient à partir d'un anneau d'épithélium germinatif ceinturant la partie distale de chaque acinus (Figure 2). Les ovocytes restent accolés à la paroi de l'acinus, s'entourent de cellules folliculeuses et migrent au cours de leur croissance vers le cul-de-sac de l'acinus où s'accumulent les plus gros d'entre eux; ils se détachent ensuite de la paroi et tombent dans la lumière de l'acinus lors de l'ovulation, puis passent, sans doute très rapidement, dans le canal collecteur, et au delà dans la partie hermaphrodite des tractus. Les cellules mâles, en forme de poire au stade spermatogonie et spermatocyte, évoluent dans la lumière de l'acinus, néanmoins implantées dans les cellules de Sertoli, plus rarement dans les cellules folliculeuses. Lorsque la spermiogenèse est achevée, les spermatozoïdes se détachent et suivent nécessairement le même trajet que les ovocytes mais sans doute beaucoup plus lentement, puisqu'il est fréquent de les observer, groupés en faisceau mais libres, dans la lumière de l'acinus et dans le canal collecteur.

Le rôle des cellules de Sertoli et des cellules folliculeuses mérite quelques commentaires:

- en étudiant, chez *L. stagnalis*, leur structure, leur mode de division et leur fonction phagocytaire, Aubry (1954) rapproche les cellules nourricières (au sens d'Ancel, 1903) des cellules de Sertoli des Vertébrés. Cette terminologie (Sertoli cells) sera reprise par Pan (1958) puis par les auteurs ultérieurs,

- chez *B. glabrata*, de Jong-Brink *et al.* (1977) confirment le rôle nourricier des cellules de Sertoli en faveur des cellules sexuelles mâles et confirment également leur rôle phagocytaire lors de la spermiation. Les auteurs excluent que ces cellules puissent produire des hormones. Ce point de vue sera néanmoins nuancé chez *L. stagnalis*, de Jong-Brink *et al.* (1981) montrant que les cellules de Sertoli produisent des stéroïdes. Chez *L. stagnalis*, les cellules de Sertoli s'organisent en couche séparant dans l'acinus un compartiment supérieur (distal) mâle et un compartiment proximal femelle (de Jong-Brink *et al.*, 1984). Rien de tel n'existe chez *B. glabrata*,

- Raven (1963) a donné les premières informations significatives sur les cellules folliculeuses de *L. stagnalis*. Les contacts entre cellules folliculeuses et ovocytes ont été étudiés en microscopie électronique chez *H. trivolvis* et *H. duryi* (Khan et Saleuddin, 1983). Chez *P. corneus*, les cellules folliculeuses montrent une forte polyploïdisation et une active synthèse d'ARN et de protéines (Bottke et Tiedke, 1988). La fonction des cellules folliculeuses a été discutée par de Jong-Brink *et al.* (1976) chez *B. glabrata*; les auteurs justifient l'élimination de différents rôles possibles et ne retiennent comme probable qu'une intervention dans la formation de la cavité folliculaire et l'ovulation; ils excluent toute production, à ce niveau, de stéroïdes.

***La différenciation des cellules sexuelles***

La gonade de *B. glabrata* montre deux gamétogenèses, mâle et femelle, qui se déroulent:

- simultanément (cette affirmation sera ultérieurement infléchie en ce qui concerne la période de démarrage de l'activité sexuelle, mais reste valable pour l'essentiel de la durée de l'activité reproductrice),
- côte à côte, au sein de chaque acinus.

L'hermaphrodisme est de type simultané, non ségrégé. Pourquoi les cellules germinales primordiales vont-elles se différencier en cellules sexuelles mâles ou femelles ?

Pour répondre à cette question, la mise au point de milieux de culture anhormonaux a constitué un énorme progrès méthodologique puisqu'il est devenu possible de suivre l'évolution d'un organe, ici la gonade, hors de son environnement naturel, à l'abri de toute influence éventuelle exercée par d'autres organes, tissus ou cellules. L'adaptation d'une technique, mise au point chez les Oiseaux, à des groupes zoologiques les plus variés, prouve la qualité de l'apport méthodologique et technique de Wolff et Haffen (1952).

Chez les Mollusques, après les premières expériences de survie *in vitro* de coeur de planorbe (Chernin, 1963), Streiff et Peyre (1963) puis Streiff (1964) réalisèrent les premières cultures organotypiques de gonade chez un Prosobranche marin hermaphrodite, *Calyptraea chinensis*.

Ultérieurement, d'autres cultures de gonade furent réalisées chez plusieurs espèces de Prosobranches marins ou dulçaquicoles, hermaphrodites ou gonochoriques mais aussi chez des Pulmonés Stylommatophores (escargots et limaces) (cf. références *in*: Vianey-Liaud, 1990: 19-20).

Chez les Basommatophores, seul le cas de *B. glabrata* a été abordé:

- l'anatomie des Planorbidae permet de réaliser des explantations *in vitro*. En effet (cf. plus haut), sur les 3/4 proximaux de sa longueur, l'ovotestis n'est pas accolé à la glande digestive. Le tégument étant par ailleurs extrêmement facile à éliminer, il est alors possible d'explanter une fraction importante de l'ovotestis, libre de tout tissu environnant (à l'inverse, pour des raisons purement anatomiques, l'isolement puis l'explantation de l'ovotestis est sans doute définitivement impossible à réussir chez *L. stagnalis*.),
- en s'appuyant sur les techniques décrites par Benex (1961, 1964, 1966), la culture en milieu diphasique (phase gélosée surmontée d'une phase liquide) a été décrite par Vianey-Liaud et Lancastre (1968). D'autres techniques, plus directement dérivées de celle de Wolff et Haffen, furent utilisées et également appliquées à des ovotestis d'adulte cultivés seuls ou en association avec le système nerveux central (SNC), ainsi qu'à des gonades issues d'individus immatures (Vianey-Liaud, 1970, 1973a).

Les résultats, déjà anciens, obtenus par culture, montrent, en résumé, qu *in vitro*:

- l'ovogenèse se poursuit,
- la spermatogenèse se poursuit également mais est limitée à l'apparition de spermatogonies,
- l'association ovotestis-SNC favorise le déroulement de la méiose mâle,
- la spermiogenèse est toujours absente.

L'espoir qui présidait à la mise en oeuvre de ces cultures, était de démontrer chez une nouvelle espèce, *B. glabrata*, le phénomène d autodifférenciation ovarienne (Figure 3), suggéré puis démontré (Charniaux-Cotton, 1959, Charniaux-Cotton et Ginsburger-Vogel, 1962) chez les Crustacés et retrouvé ultérieurement dans divers phyla dont les Mollusques (Streiff, 1966, 1967, Lubet et Streiff, 1969; Griffond, 1969; Guyard, 1969) A la différence des cas précités, la différenciation *in vitro* de spermatogonies interdit de conclure à l'existence d'une autodifférenciation ovarienne chez *B glabrata*, au moins en ce qui concerne les stades auxquels j'ai pu réaliser les explantations (Figure 3)

La différenciation de cellules mâles en culture pourrait s'expliquer par:

- une détermination des gonocytes primordiaux très précoce et qui se maintiendrait après la mise en culture,
- l'existence d'un inducteur masculinisant d'origine intragonadique dont la production se poursuivrait *in vitro*.

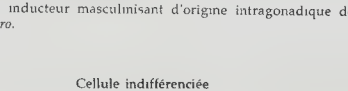



Figure 3 Différenciation des gonocytes chez *B. glabrata*. L'existence d'un facteur androgène, bien que probable, reste hypothétique.

On ne peut s'empêcher de rapprocher cette deuxième hypothèse des observations de de Jong-Brink *et al.* (1981) qui mettent en évidence, chez *L. stagnalis*, de faibles quantités de stéroïdes intragonadiques dont l'action s'exerce localement. Cependant, faute de la moindre preuve, il convient d'observer la plus grande prudence et surtout d'éviter de faire dire à des auteurs ce qu'ils se sont à juste titre bien gardés d'exprimer.

Si l'association ovotestis-SNC permet d'obtenir la méiose mâle, elle est cependant insuffisante pour rétablir la spermiogenèse. La différenciation du spermatozoïde nécessite sans doute la présence d'inducteur(s) soit absent(s) dans l' association gonade-SNC soit non libéré(s). Une telle situation n'est d'ailleurs pas limitée à *B. glabrata* et se retrouve aussi (Griffond, 1975) chez le Prosobranche gonochorique *Viviparus viviparuss*.

## LES TRACTUS GENITAUX

### *Morphologie*

La première description morphologique des tractus génitaux chez un Planorbidae (*Planorbarius corneus*) fut publiée par Baudelot (1863).

Chez *B. glabrata*, on peut signaler les travaux de Paraense et Deslandes (1955b), Pan (1958), de Jong-Brink (1969), Paraense (1976). Une mutation faisant apparaître des individus biphalliques est signalée par Richards et Minchella (1986).

Au-delà des problèmes de terminologie (cf. plus haut), ces études, ainsi que celles réalisées chez d'autres espèces (cf. références *in* Vianey-Liaud, 1990), sont au total convergentes, comme le confirment plusieurs articles de synthèse (Duncan, 1960a, 1960b, 1975).

L'organisation des tractus génitaux a été indiquée précédemment et, au sens morphologique, comprend:
- le canal collecteur commun et son renflement distal,
- le canal en "S",
- une partie hermaphrodite incluant les vésicules séminales, où sont stockés les spermatozoïdes, et la partie distale du canal hermaphrodite,
- la voie mâle,
- la voie femelle *s.s.* flanquée de deux annexes: la glande de l'albumine et la spermathèque (= *bursa copulatrix* = gametolytic gland).

### *Anatomie microscopique*

Au moins huit espèces de Planorbidae ont été l'objet d'études microscopiques (cf. références *in* Vianey-Liaud, 1990).

Chez *B. glabrata*, diverses informations ont été apportées par Faust et Hoffman (1934), von Brand et Files (1947), Marcuzzi (1950) La première étude histologique d'ensemble, incluant ovotestis et tractus génitaux, est due à Pan (1958). Cependant, les meilleures informations, réunissant observations histochimiques et ultrastructurales, sont celles publiées par de Jong-Brink (1969); cet article reste, après plus d'un quart de siècle, la véritable référence sur le sujet et aucun travail d'ensemble ne sera dès lors publié. Seules seront disponibles deux études portant sur la spermathèque (= glande gamétolytique) (Kitajima et Paraense, 1983; Rogers et Reeder, 1987).

La région du "carrefour génital" réunit, sur quelques fractions de millimètre, la partie distale du canal hermaphrodite, le débouché de la glande de l'albumine et la partie proximale des voies génitales mâle et femelle. Des études anatomiques et fonctionnelles ont été consacrées à cette région chez plusieurs Basommatophores évolués (Hygrophila):
- *L. stagnalis*: Baudelot (1863), Holm (1946), Alaphilippe et Regondaud (1959), Plesh *et al.*, (1971), Brisson *et al.*, (1977),
- *Bulinus truncatus*: Brisson et Collin (1977), Brisson (1982),
- *P. corneus*: Alaphilippe et Régondaud (1959), Brisson *et al.*, (1977).

Aucune étude particulière de cette région n'a été effectuée chez *B. glabrata*. On peut néanmoins espérer que la proximité systématique de *B. glabrata* avec les autres Ancyloplanorbidae étudiés se traduit par une similitude morphologique et fonctionnelle; cela reste cependant aujourd'hui totalement spéculatif.

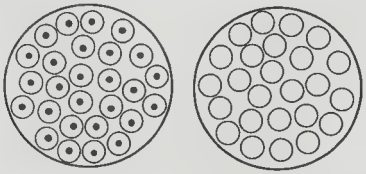
La glande qui produit le fluide périvitellin dans lequel l'embryon se développe est classiquement appelée en français "glande de l'albumine". Bayne (1973) insiste sur la nécessité d'utiliser, en anglais, "albumen" et non "albumin" puisque ce dernier terme ne désignerait qu'un groupe particulier de protéines alors que ce ne sont pas les seules protéines présentes (Michelson et Dubois, 1977, Herberts *et al.*, 1989). Des auteurs français se sont pliés à l'argument (justifié) de Bayne et parlent maintenant de "glande de l'albumen" ou "à albumen". Je regrette pour ma part ce nouveau vocable; en effet, tout changement dans la terminologie devrait avoir pour seul but de rendre plus précis le vocabulaire utilisé. Malheureusement, loin d'être une amélioration, se crée ainsi de toutes pièces, une homonymie entre la sécrétion d'une glande de Mollusque et un tissu végétal triploïde. On passe ainsi encore à côté du caractère original de cette glande, tous les auteurs s'accordent sur ce point, qui est la sécrétion, outre de protéines, de galactogène, polymère du galactose, comme cela a été démontré chez divers Mollusques dont *B. glabrata* (Mc Mahon *et al.*, 1957, Corrêa *et al.*, 1967, de Jong-Brink, 1969). Faute d'un accord entre malacologistes sur un terme faisant référence au galactogène, je continuerai à utiliser en français "glande de l'albumine", expression fleurant bon le 19ème siècle mais pas plus imprécise qu'un anglicisme ambigu.

## LA CASTRATION CHIRUGICALE

La technique de castration été détaillée (Vianey-Liaud, 1972). Elle permet d'opérer des planorbes adultes (Vianey-Liaud, 1972, 1979a) ou juvéniles (Vianey-Liaud, 1972) et d'effectuer une gonadectomie totale (Vianey-Liaud, 1972, 1979a) ou partielle (Vianey-Liaud, 1979a).

### *Castration post-pubérale*

La castration partielle est suivie, sans retard significatif par rapport aux témoins, du dépôt de pontes fertiles. La castration totale bloque, dans un premier temps, toute oviposition. Plus tard, avec un retard significatif d'au moins trois semaines par rapport aux témoins, on assiste aux premiers dépôts de pontes, toutes dépourvues d'embryon, donc stériles. Même après 36 semaines, aucune ponte fertile n'est jamais déposée (Figure 4).



Castration pré-pubérale Castration post-pubérale

Figure 4. Pontes déposées après castration chirurgicale pré- et post-pubérale chez *Biomphalaria glabrata*. Après castration pré pubérale, s il y a régénération germinale, les oeufs (cercles blancs) contiennnent des embryons (points noirs) (= pontes fertiles). Après castration post-pubérale, les oeufs sont dépourvus d'embryon (= pontes stériles).

La fréquence de l'oviposition (nombre de pontes/animal/semaine) et la fécondité (nombre d'oeufs/animal/semaine chez les témoins et les castrées partielles ou nombre de sphères d'albumine chez les castrées totales) ont été suivies durant 20 semaines (Figure 5) et statistiquement analysées (Vianey-Liaud, 1979a). On peut retenir que chez les castrées partielles, l'oviposition est reduite juste après l'opération mais ultérieurement ne diffère plus de celle des témoins. La castration totale entraîne une production de pontes et de sphères significativement inférieures à celles des témoins.

Tableau 2. Poids sec du corps et des différentes parties des tractus génitaux 20 jours après castration post-pubérale totale chez *Biomphalaria glabrata*. Les poids du corps sont comparés par analyse de variance. Les poids relatifs par rapport au corps de l'appareil génital sont comparés par analyse de covariance. m = moyenne; Sm = erreur-type.

| **Poids sec** | Total corps ($10^{-3}$ g) | vésicules séminales ($10^{-5}$ g) | glande de l'albumine ($10^{-5}$ g) | partie mâle ($10^{-5}$ g) | partie femelle ($10^{-5}$ g) | pénis ($10^{-5}$ g) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **castrats totaux** m ± Sm | 95 ± 12 | 32 ± 14 | 85 ± 16 | 40 ± 07 | 91 ± 10 | 42 ± 08 |
| **témoins** m ± Sm | 121 ± 12 | 38 ± 06 | 116 ± 20 | 58 ± 06 | 108 ± 12 | 51 ± 04 |
| *p* | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

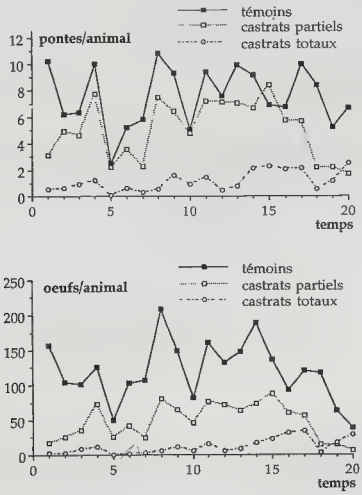



Figure 5. Effets de la castration post pubérale totale ou partielle sur la ponte et la production d oeufs chez *B. glabrata*. Les témoins et les castrats partiels produisent des oeufs fertiles; les castrats totaux produisent des oeufs stériles, dépourvus d embryon. Le temps est exprimé en semaines.

Le poids relatif par rapport au corps des différentes parties de l'appareil génital n'est pas affecté, à court terme (20 jours) par la castration totale (Tableau 2). La castration n'entraîne pas de régression des tractus génitaux mais il n'y a pas non plus d'hypertrophie, bien que leur fonctionnement soit bloqué. A plus long terme, la castration n'entraîne pas de différence statistique du poids relatif des voies génitales mâle et femelle, de la glande de l'albumine et du complexe pénien; au contraire, les vésicules séminales montrent un poids relatif significativement inférieur, car la castration empêche l'apport de nouveaux spermatozoïdes (Vianey-Liaud, 1979a).

*Castration pré-pubérale*

La gonadectomie étant effectuée sur des planorbes immatures, les effets sur la reproduction ne peuvent réellement s'estimer que lorsqu'elles ont atteint une taille égale ou supérieure à celle des témoins sexuellement mûrs. On distingue alors (Vianey-Liaud, 1972) deux catégories de planorbes:

- celles, stériles, qui ne déposent aucune ponte,
- celles, fertiles, qui déposent des pontes embryonnées (Figure 4).

La morphologie des tractus génitaux n'est jamais de type juvénile, même chez les planorbes stériles (Vianey-Liaud, 1972) Par rapport aux témoins, l'analyse pondérale des tractus génitaux (Tableau 3) des castrées montre que:

- le poids absolu et le poids relatif des vésicules séminales sont statistiquement inférieurs,
- le poids absolu de la voie mâle, de la voie femelle et du pénis ne diffèrent pas tandis que les poids relatifs respectifs sont statistiquement inférieurs,
- le poids absolu de la glande de l'albumine est environ 2,5 fois plus élevé mais le poids relatif n'est pas statistiquement différent.

Tableau 3. Poids sec du corps et des différentes parties des tractus génitaux trois mois après castration pré-pubérale chez *B. glabrata*. Les poids du corps sont comparés par analyse de variance. Les poids relatifs par rapport au corps de l'appareil génital sont comparés par analyse de covariance. m = moyenne, Sm = erreur-type.

| **Poids sec** | Total corps | vésicules séminales | glande de l'albumine | partie mâle | partie femelle | pénis |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ($10^{-3}$ g) | ($10^{-5}$ g) | ($10^{-5}$ g) | ($10^{-5}$ g) | ($10^{-5}$ g) | ($10^{-5}$ g) |
| **castrats totaux** m ± Sm | 306 ± 37 | 18 ± 05 | 947 ± 166 | 78 ± 08 | 420 ± 61 | 36 ± 10 |
| **témoins** m ± Sm | 122 ± 21 | 45 ± 07 | 393 ± 94 | 75 ± 09 | 338 ± 55 | 37 ± 04 |
| *p* | < 0,01 | < 0,01 | n.s. | < 0,01 | < 0,01 | < 0,01 |

*Quinze ans de débats*

Chez dix espèces de Stylommatophores (cf. références *in* Vianey-Liaud, 1990), la castration chirurgicale (ainsi que des expériences d'implantation et de culture d'organes), permet de démontrer que la gonade contrôle, par voie endocrine, le développement et le fonctionnement des tractus génitaux (Joosse et Geraerts, 1983).

En s'appuyant sur des observations relatives à la castration parasitaire mais aussi chirurgicale, Harry (1965) propose un schéma identique chez *B. glabrata*. A l'inverse, Brisson (1967), chez *Bulinus truncatus*, démontre l'absence de contrôle des tractus par l'ovotestis; il généralise ses conclusions chez *Bulinus globosus* et deux planorbes *Tropicorbis centimetralis* et

*Planorbarius corneus* (Brisson, 1971). Comme on pouvait encore la croire due à des différences de développement des animaux castrés, cette apparente contradiction entre les résultats des deux auteurs m'a incité à réétudier la castration chirurgicale chez *B. glabrata*. Les conclusions (Vianey-Liaud, 1972, 1979a) sont conformes à celles de Brisson. Curieusement, Boer *et al.* (1976) reprennent les expériences de castration chez *Bulinus truncatus*, mais ne citent ni Harry ni mes résultats de 1972; l'oubli est réparé rapidement par de Jong-Brink *et al.* (1979) qui concluent que "ces observations suggèrent que la croissance des tractus génitaux n'est pas sous le contrôle hormonal de l'ovotestis et confirmeraient les résultats préalables obtenus chez *Bulinus truncatus* et quelques Basommatophores". Geraerts et Mohamed (1981) chez *Bulinus truncatus*, Miksys et Saleuddin (1987) chez *Helisoma duryi* auront des conclusions semblables. Malgré une brève résurrection en 1982, l'hormone gonadique des Basommatophores a maintenant disparu, à juste titre, de la littérature.

Si les tractus génitaux de *B. glabrata* ne sont manifestement pas sous le contrôle de la gonade, il reste à expliquer pourquoi certaines castrées pré-pubérales sont fertiles, d'autres stériles, tandis que les castrées post-pubérales sont toujours stériles, même si elles déposent des pontes. Après castration post-pubérale, ni l'épithélium du canal hermaphrodite, ni *a fortiori* celui des vésicules séminales n'ont de pouvoir de régénération germinale; les tractus génitaux qui avaient fonctionné avant la castration poursuivent leur activité en l'absence d'ovotestis. Après castration pré-pubérale, le dépôt de pontes fertiles est certainement dû à une régénération germinale au dépens de la courte portion du canal hermaphrodite reliant l'ovotestis et les vésicules séminales. A partir d'études microscopiques, un tel phenomène avait été d'ailleurs prévu chez *L. stagnalis* (Aubry, 1956; Bounoure et Aubry, 1956). Les cas de stérilité totale (absence de ponte) s'expliquent par une gonadectomie qui a eu lieu au niveau des vésicules séminales dont l'épithélium n'aurait aucune potentialité germinale. En l'absence de gonade, la production et le dépôt de pontes ne peut se réaliser que si le processus a été initié avant la castration.

## APPARITION DE LA MATURITÉ SEXUELLE

Le dépôt des premières pontes est classiquement considéré comme témoignant du début de l'activité sexuelle, tant chez des *B. glabrata* élevées en groupe que chez des individus isolés dès l'éclosion. Avant toute manifestation concrète de la reproduction (transfert de sperme ou ponte), il est nécessaire que soient présents tous les stades d'au minimum une des deux gamétogenèses, mâle ou femelle, et que la voie correspondante des tractus génitaux soit fonctionnelle.

A ma connaissance, il n'existe, chez *B. glabrata*, aucune description microscopique (photonique ou électronique) ou histochimique du développement des tractus génitaux et particulièrement de leurs éléments glandulaires. On dispose par contre d'une étude planimètrique des organes mâles distaux (prostate et complexe pénien) (Meier et Meier-Brook, 1981) et volumétrique des organes mâles, des organes femelles *s.s.* et de la glande de l'albumine (Théron et Gérard, 1994).

La croissance volumétrique de l'ovotestis a été étudiée par Thérond et Gérard (1994). Durant l'essentiel de la durée de l'activité sexuelle, les deux gamétogenèses coexistent au sein des acini (cf. plus haut). Les premières cellules sexuelles apparaissent-elles simultanément ou décalées dans le temps ? Poser cette question est d'autant plus légitime que:

- plusieurs espèces de Basommatophores primitifs sont des hermaphrodites protandres (cf. références *in*: Hubendick, 1978),

- même chez des espèces évoluées, une courte phase mâle peut précéder l'établissement ultérieur d'un hermaphrodisme simultané: *L. stagnalis* (Fraser, 1946), *Physa fontinalis* (Duncan, 1959), *Laevapex fuscus* (Russell-Hunter et McMahon, 1976), *Bulinus globosus* (Rudolph, 1983), *Physa heterostropha* (Wethington et Dillon, 1993).

J'ai observé, en microscopie photonique, de jeunes individus montrant des spermatozoïdes dans l'ovotestis et les vésicules séminales, alors qu'aucun ovocyte n'avait atteint sa taille maximum (Vianey-Liaud, 1990), ce qui suggère l'existence d'une phase protandre chez *B. glabrata*.

Lorsque des *B. glabrata* immatures (n'ayant déposé aucune ponte) sont appariées à des partenaires vierges et fertiles (déposant des pontes issues exclusivement d'autofécondations), 90 % de ces dernières produisent alors des embryons issus de fécondations croisées. La copulation comme mâle et le transfert de sperme sont possibles en moyenne 6,0 ± 2,4 jours avant le dépôt par le même individu de ses premières pontes issues d'autofécondations. Il existe donc, chez *B. glabrata*, une période potandre fonctionnelle de courte durée qui précède l'établissement ultérieur d'un hermaphrodisme simultané (Trigwell et Dussart, 1998).

Il est classique de considérer que la maturité sexuelle (dépôt de la première ponte) survient quand les animaux atteignent un diamètre de 10 à 11 mm (Brumpt, 1941) ou 11 à 12 mm (Ritchie *et al.*, 1963). Ces valeurs, qui sont souvent reprises dans la littérature, sont pourtant a considérer avec prudence. J'ai eu l'occasion de comparer, au laboratoire, deux lots de 30 *B. glabrata* homozygotes pigmentées et albinos (Vianey-Liaud, 1989). Les résultats sont rappelés dans la Figure 6.

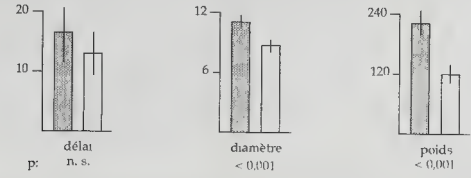



Figure 6. Apparition de la maturité sexuelle chez *B. glabrata*. Colonnes sombres = planorbes homozygotes pigmentées CC Colonnes claires = planorbes homozygotes albinos cc. Le délai, exprimé en jours, est déterminé arbitrairement à partir du jour 0 correspondant au dépôt de la première ponte Le diamètre de la coquille est exprimé en millimètres. Le poids frais total est exprimé en milligrammes. Les intervalles de confiance sont calculés pour la probabilité p = 0,05.

Si les délais moyens ne diffèrent pas statistiquement entre les deux souches, la variation à l'intérieur de chaque souche est néanmoins considérable: 34 jours pour les albinos, 37 jours pour les pigmentées. A l'inverse, diamètre et poids moyens diffèrent statistiquement entre les deux souches mais surtout les valeurs extrêmes montrent une grande variabilité. Au total, la maturité sexuelle pourra être atteinte par des *B. glabrata* de 6,1 mm et 42 mg, tandis qu'elle surviendra 41 jours plus tard chez d'autres individus présentant alors un diamètre de 13,4 mm et un poids de 358 mg.

Les résultats observés montrent une grande variabilité, bien que les animaux aient été élevés isolément dès l'éclosion dans des conditions identiques (à l'échelle d'une paillasse) et que seule l'autofécondation soit à l'origine des pontes enregistrées. La plus grande prudence s impose donc à l'expérimentateur. Pour sélectionner, par exemple, des individus sexuellement mûrs, il faut impérativement éviter de prendre uniquement en considération une taille dite "moyenne" et vérifier préalablement, animal par animal, son aptitude à pondre. Même si cela peut paraître fastidieux, c'est indispensable, sauf à expérimenter sur des animaux dont l'état sexuel serait mal contrôlé.

## L'ACCOUPLEMENT

*B. glabrata* étant élevée dans beaucoup de laboratoires, nombreux sont les chercheurs qui ont eu l'occasion d'observer des planorbes en train de s'accoupler. Jusqu'à une date récente, la littérature était pourtant assez pauvre et limitée en fait aux observations de Brumpt (1941). Il ressortait de ces travaux que:

- les *B. glabrata* forment des pariades unilatérales, un animal fonctionnant comme mâle, l'autre comme femelle,

- dans certains cas, un animal peut fonctionner simultanément comme mâle et femelle, mais avec deux partenaires différentes, l'une fonctionnant alors comme femelle, l'autre comme mâle,
- il n'y a pas de double accouplement réciproque, chaque partenaire fonctionnant simultanément comme mâle et femelle.

*A deux ou à plusieurs*

Des études récentes, portant sur des paires d'individus, ont été consacrées au comportement précopulatoire et ont permis de décrire les différentes manoeuvres préparatoires à la copulation. Il a été également montré que le sens de l'accouplement (quel animal se comportera comme mâle ou femelle ?) est déterminé par la planorbe qui copulera ultérieurement comme mâle; l'animal qui adoptera le rôle femelle est en fait passif, et cherche même souvent à éviter le futur "mâle" (Trigwell *et al.*, 1997).

Les accouplements (unique ou successifs, avec ou sans inversion du rôle) présentent des modalités assez variables qui peuvent être regroupés en six stratégies (Trigwell *et al.*, 1996). Il est à souligner que des accouplements bilatéraux réciproques, réputés ne jamais survenir, ont pu être observés, à une fréquence faible (environ 5 % des cas) qui les avait jusqu'à présent fait échapper aux observations (Figure 7)

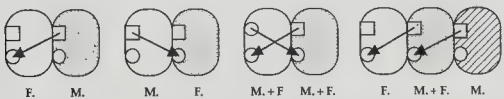



Figure 7 Différents types d'accouplement chez *B. glabrata*. Les carrés et les cercles symbolisent les orifices sexuels mâles et femelles. Les flèches indiquent le sens de l accouplement et le transfert de sperme. F. = accouplement comme "femelle"; M. = accouplement comme "mâle".

Au sein de groupes de 10 individus, aucun animal, sur une période de 12 heures, ne copule significativement plus souvent comme mâle que comme femelle. A moins qu'il ne soit temporairement isolé de ses partenaires potentiels, il n'a pas été observé d'alternance des rôles (mâle puis femelle ou vice versa) joués par un individu au cours d'accouplements consécutifs ou non (Vernon et Taylor, 1996).

Au laboratoire, dans des conditions d'illumination proches des variations saisonnières, Pimentel-Souza *et al.* (1988) montrent que les appariements (qui impliquent deux individus dans l'immense majorité des cas) sont plus nombreux l'automne et l'hiver que le printemps et l'été.

*Castration et accouplement*

Après infestation par *S. mansoni*, les planorbes s'accouplent (Rupp, 1996), durant la période patente, moins fréquemment que les témoins mais se comportent plus souvent comme "mâle" que comme 'femelle". Vis à vis de l'infestation, les *B. glabrata* choisissent préférentiellement des partenaires de statut opposé (infesté-non infesté) plutôt que de statut semblable (infesté-infesté ou non infesté-non infesté). Les planorbes soumises au jeûne s'accouplent moins que les témoins mais plus souvent comme "mâle" que comme 'femelle" (Rupp, 1996). Cette dernière observation peut être reliée à la conservation de l allosperme durant le jeûne (Vianey-Liaud et Dussart, 1994), les animaux pouvant pratiquer la fécondation croisée sans avoir à se comporter comme femelle.

Après castration chirurgicale totale (Figure 14), les *B. glabrata* peuvent s'accoupler comme "mâle", comme "femelle" ou simultanément comme "mâle" et "femelle" (Vianey-Liaud, 1992).

## AUTOFÉCONDATION ET FÉCONDATION CROISÉE

### *Une espèce, deux modes de fécondation*

*B. glabrata* peut se reproduire par autofécondation (Brumpt, 1941; Paraense, 1955; Azevedo *et al.*, 1958). Une planorbe isolée dès l'éclosion atteint la maturité sexuelle et dépose des pontes fertiles. Les individus obtenus en première génération sont eux-mêmes aptes à se reproduire en isolement strict. Tous les auteurs s'accordent pour définitivement rejeter l'éventualité d'une reproduction par parthénogenèse.

Au contraire, les animaux groupés recherchent (et trouvent) un partenaire et se reproduisent préférentiellement par fécondation croisée (Brumpt, 1941; Paraense, 1955). A titre d'exemple, je rappelerai que, ayant réuni 30 planorbes sexuellement mûres mais préalablement isolées durant 50 jours, 28 d'entre elles étaient accouplées au bout d'une demi-heure (Vianey-Liaud, 1976).

Quelle que soit l'estimation du nombre d'espèces actuelles de Basommatophores, ce n'est que chez un petit nombre d'entre elles que la reproduction par autofécondation a été recherchée puis démontrée. Larambergue (1939) relève 32 espèces dont 15 lymnaeidés, 6 physidés, 1 ancylidé, 2 bulins et 8 planorbes. Brumpt (1941) modifie légèrement cette liste, supprime deux lymnaeidés mais ajoute *Australorbis glabratus* (= *Biomphalaria glabrata*). On peut cependant noter que certaines populations de *B. glabrata* (et de *B. straminea*) sont auto-stériles, l'oviposition étant induite par une copulation préalable (Paraense, 1993). Paraense et Corrêa (1988) recensent 30 espèces de planorbidés autoféconds (incluant *Bulinus truncatus* et *B. forskali*) et y ajoutent deux hélisomatinés: *Helisoma trivolvis* et *H duryi* alors que cette dernière espèce était considérée comme se reproduisant strictement par fécondation croisée (De Witt et Sloan, 1959; Madsen *et al.*, 1983). Sans expressément le signaler, mais ayant utilisé cette potentialité à titre expérimental, on peut augmenter la liste d'une autre espèce *Biomphalaria pfeifferi* (Vianey-liaud, 1984). Des travaux complémentaires peuvent cependant faire évoluer le statut de certaines espèces. Ainsi, *Planorbis planorbis* (Holzfuss, 1914; Allen, 1935) et *P corneus* (Holzfuss, 1914) sont réputées autofécondes. Cependant, comparées aux individus groupés, elles ne montrent pourtant qu'une production d'oeufs et un taux d'éclosion très réduits. Ce taux peut même être nul chez *Planorbis planorbis* qui ne devrait plus être considérée comme autoféconde (Costil et Daguzan, 1995).

### *Deux modes de fécondation dans deux lieux différents*

Le lieu de la (des) fécondation(s) reste un mystère assez bien gardé chez les Basommatophores. Pourtant, d'anciennes dénominations de certaines parties de l'appareil génital présupposaient que ce(s) lieu(x) était(en)t connu(s): chambre de fécondation, fertilization pocket, etc.

En dehors des excellentes observations réalisées à partir d'un suivi histologique du sperme dans l'appareil génital chez *Bulinus truncatus* (Larambergue, 1939), c'est chez *B. glabrata* que les résultats les plus convaincants ont été obtenus (Paraense, 1976).

A partir de l'utilisation de spermatozoïdes marqués au fer radioactif (59 Fe), il est démontré que:

- le sperme reçu lors de l'accouplement s'accumule dans la spermathèque (= glande gamétolytique) et l'ovotestis,
- l'ovotestis de la planorbe "femelle" est le lieu de la fécondation croisée,
- les vésicules séminales de la même planorbe sont le lieu de l'autofécondation.

La coexistence, côte à côte dans chaque acinus gonadique, des gamètes mâles et femelle, a longtemps fait logiquement supposer que l'autofécondation survenait au sein même de la gonade. Une telle prévision avait d'ailleurs été formulée pour d'autres espèces (Aubry, 1955). Le suivi des spermatozoïdes marqués montre qu'il n'en est rien (chez *B. glabrata*). Les spermatozoïdes présents dans la gonade ont besoin d'une maturation qui n'est acquise qu'ultérieurement, dans les vésicules séminales. En effet, après castration chirurgicale totale, les *B. glabrata* sont aptes à copuler, entre autres, comme mâle et à transférer à une partenaire l'autosperme stocké dans les vésicules

séminales. Cependant, une quinzaine de jours après la castration, soit un stockage d'au minimum la même durée, sont nécessaires pour que les spermatozoïdes puissent, après transfert, réellement être utilisés (comme allosperme) pour participer à des fécondations croisées (Vianey-Liaud, 1992).

Plus surprenante encore est la localisation de la fécondation croisée, dans l'ovotestis de la planorbe "femelle" alors que la région classiquement considérée comme lieu probable était le carrefour (Berry, 1977) ou la partie distale du canal hermaphrodite (Alaphilippe, 1959). En effet, s'il est facile d'admettre que le sperme reçu lors de la copulation remonte la voie femelle jusqu'à la région du carrefour, sa présence dans l'ovotestis implique nécessairement qu'il traverse les vésicules séminales où est stocké l'autosperme (cas d'une planorbe préalablement vierge après une première insémination) Ce "croisement" des deux spermes (auto- et allo-sperme) reste mécaniquement difficile à concevoir; il faut aussi admettre que pendant cette migration, l'autosperme reste seul capable de féconder les ovocytes qui pourraient être présents dans les vésicules séminales. Par contre, que l'allosperme puisse féconder les ovocytes au sein de la gonade prouve que ceux ci sont aptes à être fertilisés et que l absence d'autofécondation intragonadique est due à l'immaturité de l'autosperme et non aux ovocytes.

Relativement surprenants, ces résultats (Paraense, 1976) ont parfois été critiqués, ce qui est parfaitement légitime. Beaucoup moins admissible est qu'ils ont été souvent ignorés par des auteurs ultérieurs (faut-il y voir un scepticisme implicite qui n'a pas osé s'exprimer ou le fait que la revue où ils furent publiés n'était pas jugee "sérieuse" ?). Il reste que ce sont encore aujourd'hui les seules informations crédibles dont on dispose chez les Basommatophores. Ce problème va être repris prochainement, en utilisant une méthode comparable mais avec un marquage radioactif plus classique du sperme (thimidine tritiée) (Beeman, 1970) et, qu'il y ait ou non confirmation des resultats acquis chez *B. glabrata*, étendu à d'autres espèces de Mollusques dulçaquicoles.

***Des petits et des gros individus: le droit à la fécondation croisée***

La maturité sexuelle survient assez tôt au cours du cycle de vie et la croissance se poursuit longtemps après son apparition La taille des animaux mûrs qui peuvent coexister dans un groupe varie du simple ou double, voire au triple. Dans ces conditions, il existe des différences de taille considérables portant sur l'appareil génital et particulièrement les parties impliquées dans l accouplement, pénis s l. et vagin, ces différences de taille entre partenaires potentielles sont-elles un obstacle à l'accouplement et à l'insémination ?

Le problème n'a été étudié que pour des paires d'individus de taille variable. Des *B. glabrata* de petite ou de grande taille préalablement vierges s'accouplent comme mâle ou comme femelle, quelle que soit la taille de la partenaire, dans l'immense majorité des cas (Tableau 4).

Tableau 4 Mode de fécondation, détermine par l'analyse de la descendance produite par le parent albinos, en fonction de la taille des partenaires chez *B. glabrata*.

| couples | pigmenté "mâle" | albinos "femelle" | allofécondation (%) | couples | pigmenté "mâle" | albinos "femelle" | allofécondation (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | diamètre (en mm.) | | | | diamètre (en mm.) | | |
| 10 | 11 - 12 | 11 - 12 | 100 | 10 | 11 - 12 | 11 - 12 | 100 |
| 10 | 11 - 12 | 13 - 14 | 90 | 10 | 12 - 13 | 11 - 12 | 100 |
| 10 | 11 - 12 | 14 - 16 | 100 | 10 | 14 - 15 | 11 - 12 | 100 |
| 6 | 11 - 12 | 16 - 17 | 100 | 10 | 16 - 17 | 11 - 12 | 100 |
| | | | | 7 | 18 - 19 | 11 - 12 | 85,7 |

Sur 83 possibilités d'accouplement, l'insémination a eu lieu dans 81 cas (Vianey-Liaud, 1990) On doit cependant remarquer que dans ce protocole expérimental, les planorbes étaient appariées deux à deux et n'avaient pas de véritable choix quant à leur possible partenaire. Il reste a savoir si, en présence de plusieurs partenaires de taille différente, le choix se porte de préférence sur des individus de taille comparable ou est indépendant de la taille respective. Des expériences ultérieures permettront de répondre à cette question.

Une copulation préférentielle avec des partenaires de taille (ou d'âge) voisins n'a jamais été expérimentalement démontrée; il est pourtant frappant de constater que les auteurs (sans forcément l'expliciter) utilisent volontiers des animaux de même taille ou de même âge:

- *L. stagnalis* (Duivenboden, 1983; Duivenboden et Ter Maat, 1985),
- *Bulinus globosus* (Rudolph, 1983; Rudolph et Bailey, 1985; Fryer *et al.*, 1987),
- *Bulinus africanus* (Rudolph et Bailey, 1985).

Au vu des résultats démontrés chez *B glabrata*, cette précaution implicite est peut-être inutile, elle n'entache cependant en rien les résultats expérimentaux acquis dans ces conditions. Il reste que les résultats obtenus chez *B glabrata* semblent être les seuls disponibles chez les Basommatophores, alors que les informations sont plus riches chez les Stylommatophores (Baur, 1992), les Prosobranches (Staub et Ribi, 1995) et les Opisthobranches (Switzer-Dunlap *et al.*, 1984; Yusa, 1994, 1996).

## FÉCONDITÉ

La fécondité est classiquement estimée par la mesure de trois variables:

- nombre de pontes/animal/unité de temps,
- nombre d'oeufs/animal/unité de temps,
- nombre d'oeufs par ponte.

Seul le nombre total d oeufs peut permettre d'estimer la descendance potentielle d'un individu. A ma connaissance, il n'existe pas de mesure du nombre d'oeufs réellement pondus durant la totalité du cycle de vie d'un individu, ni au laboratoire ni *a fortiori* dans la nature.

Les valeurs obtenues chez *B glabrata* par une douzaine d'auteurs ont été réunies dans un tableau (en les transformant le cas échéant en nombre de pontes ou d oeufs/animal/jour) (Vianey-Liaud, 1976). Des valeurs assez voisines sont données par Kawazoe (1977). J'ai personnellement publié diverses données numériques (Vianey-Liaud, 1976) et plus particulièrement celles obtenues sur les souches homozygotes pigmentées et albinos (Vianey-Liaud, 1989),

Les nombres de pontes, d'oeufs ou d'oeufs par ponte montrent une très grande variabilité; à titre d'exemple, chez des animaux élevés dans des conditions similaires, le nombre d'oeufs par ponte peut varier de 1 à 95 (Vianey-Liaud, 1976). Il n'existe pas d'explication simple et unique à cette variabilité.

### *Facteurs abiotiques*

D innombrables facteurs abiotiques peuvent agir sur la reproduction des *B glabrata*. Il serait fastidieux d'énumérer les publications rapportant leurs effets sur la seule fécondité. On peut néanmoins signaler Sturrock et Sturrock (1970b), Lévêque *et al*, (1978) et consulter avec profit a une revue toujours d'actualité (Appleton, 1978).

### *Corrélation taille, croissance et fécondité*

J'ai recherché, au laboratoire, s'il existait une relation entre les trois variables de la fécondité et la taille des animaux en début ou en fin d'expérience ainsi que leur croissance. Les résultats montrent sans ambiguité qu'il n'y a aucune corrélation significative entre la fécondité et la taille (diamètre, longueur de la ligne de suture) ou la croissance (Vianey-Liaud, 1976), ce qui sera d'ailleurs confirmé ultérieurement (Vernon, 1995)

Dans l'hypothèse, maintenant classique, d'une allocation préférentielle des ressources, soit vers la croissance somatique, soit vers la reproduction, les animaux à croissance rapide devraient montrer une fécondité réduite tandis que ceux à croissance plus lente montreraient une fécondité plus importante. Chez *B. glabrata*, la bibliographie, souvent contradictoire, est loin de confirmer ce modèle (cf. discussion *in* Vianey-Liaud, 1976, Tenge, 1980, cité par Schmölder et Becker, 1990). Sauf à démontrer qu'observations et expériences n'ont pas été menées avec rigueur, plutôt que de tenter d'expliquer pourquoi des faits indiscutables ne confirment pas le modèle (Vernon, 1995), il serait préférable de s'interroger sur la généralité du modèle. Qu'une corrélation négative entre croissance et reproduction soit démontrée chez une ou plusieurs espèces (Geraerts et Joosse, 1984), n'implique pas de la généraliser sans vérification cas par cas, à l'ensemble d'un groupe zoologique. Cette prudence est d'autant plus nécessaire qu'à une même situation, par exemple un stress alimentaire, les réponses peuvent être diamétralement opposées selon les espèces considérées (Rollo et Hawryluk, 1988).

Chez les hermaphrodites simultanés, l'effort de reproduction ne concerne pas que la seule production des pontes; il implique aussi la fonction mâle. Un modèle de régulation des flux d'énergie a été proposé chez *L. stagnalis*. Parmi d'autres effets, la copulation réduit la production d'oeufs (De Visser *et al.*, 1984). Des expériences similaires, avec section du canal déférent, ne sont probablement pas réalisables chez *B. glabrata*. Une étude est cependant actuellement en cours sur des animaux castrés.

*Effet de groupe*

Les résultats sont relativement aisés à interpréter lorsque les dispositifs expérimentaux sont peu nombreux. Malheureusement, multiplier les expériences en faisant varier de nombreux facteurs conduit à des résultats qui immanquablement finissent par être plus ou moins contradictoires.

Pour Brumpt (1941), "l'isolement semble avoir eu une influence légèrement favorable sur la ponte des animaux de même âge et de même taille". Chernin et Michelson (1957a, 1957b) concluent que "dans les populations denses, il y a une croissance réduite des individus ainsi qu'une réduction de leur fécondité". Parmi toutes les indications fournies, pour Perlowagora-Szumlewicz (1958), il apparaît que la fécondité est plus élevée chez les planorbes isolées que chez celles groupées. Beaucoup moins formels sont Thomas et Benjamin (1974a, 1974b) qui, selon les cas, observent une fécondité égale, ou plus, ou moins importante chez les planorbes isolées que chez les groupées.

Pour ma part, je me suis placé dans une optique un peu différente. Au lieu de comparer des lots de planorbes groupées ou isolées, j'ai cherché comment évoluait la fécondité lorsque des animaux sexuellement mûrs et groupés étaient ultérieurement isolés. Il apparaît alors qu'en 25 jours le nombre de pontes par animal et le nombre d'oeufs par ponte diminuaient d'environ 25 % tandis que le nombre d'oeufs, et c'est le point important, diminuait d'environ 40 % (Vianey-Liaud, 1976).

Chez d'autres Basommatophores, des résultats parfois contradictoires sont observés. Par comparaison avec des animaux groupés, il a été montré que les individus isolés ont une fécondité réduite chez *Physa pomilia* (DeWitt et Sloan, 1959, DeWitt, 1967), *Helisoma duryi* (DeWitt et Sloan, 1959; Saleuddin *et al.*, 1983) et *L. catascopium* (Loker, 1979). A l'inverse, la fécondité est stimulée chez les individus isolés de *Physa gyrina* (DeWitt, 1954), *L. columella* (DeWitt et Sloan, 1958), *L. stagnalis* (Noland et Carriker, 1946; Joosse, 1984; Duivenboden *et al.* 1985), *Bulinus abyssinicus* (Ahmed *et al.*, 1986), *Bulinus truncatus* (Bayomy et Joosse, 1987; Doums *et al.*, 1994) et *Bulinus globosus* (Njiokou *et al.*, 1992). Brown (1979) montre que l'accroissement de la densité réduit la fécondité chez *L. stagnalis*.

Même pour une seule espèce, faute d'un protocole commun, les résultats accumulés par les différents auteurs sont difficiles à synthétiser et surtout à généraliser. Un point paraît cependant fondamental à souligner dans l'interprétation de ce type d'expériences. A conditions par ailleurs égales (volume d'eau, surface, profondeur, nourriture disponible, lumière, etc...), diviser par exemple le nombre d'animaux par deux, revient effectivement à diviser la densité par deux. Si

passer de deux à un individu divise également la densité, le changement n'est alors plus seulement quantitatif mais aussi qualitatif. D'une façon générale, isoler des individus revient à changer progressivement le mode de fécondation, de l'allofécondation vers l'autofécondation (Figure 8).

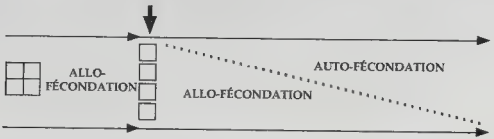



Figure 8. Changement de mode de fécondation après isolement (flèche verticale) de *B. glabrata* préalablement groupées. Les rectangles jointifs symbolisent les planorbes groupées; les flèches horizontales représentent le temps.

L'interprétation des expériences sur l'effet de groupe est rendue difficile par la multiplicité des facteurs pouvant entrer en jeu (tous ne sont pas nécessairement connus ou mesurables) et leur interaction. Une intéressante reflexion a été menée à partir du cas de *L. stagnalis* (Van Der Steen, 1977). Le problème reste posé chez *B. glabrata*.

## FERTILITÉ

Si les données disponibles sur la fécondité sont abondantes, celles sur la fertilité le sont beaucoup moins. Il est en effet nécessaire de déterminer, pour une période donnée, le nombre d'oeufs au sein desquels le développement embryonnaire est complet et réellement suivi de l'éclosion. Le comptage des embryons est cependant facilité par le fait que les pontes des planorbes ne renferment qu'une seule couche d'oeufs (Bondesen, 1950).

Brumpt (1941) fournit quelques données numériques et estime le taux d'avortement à 3 % (taux d'éclosion = 97 %). Perlowagora-Szumlewicz (1958) indique des taux d'éclosion variables selon les expériences, de 49,5 à 96,3 %. D'après les données de Ritchie *et al.* (1966), on peut calculer qu'environ 89 % des oeufs éclosent. Dans de bonnes conditions, Siefker *et al.* (1977) indiquent un taux d'éclosion de 94,7 % mais des températures élevées abaissent drastiquement ce pourcentage. Kawazoe (1977) rapporte un taux moyen d'éclosion de 95,8 % pouvant s'élever de novembre à janvier à 98 %. Pour une gamme de températures variant de 17,5°C à 27,5°C, les taux d'oeufs viables sont élevés et s'étagent d'environ 81 % à 86 % mais les taux d'éclosion sont faibles, en moyenne 0,14/animal/jour, et seraient dûs à une illumination insuffisante (Pimentel-Souza *et al.*, 1990). Face à ces pourcentages, les taux d'éclosion, ainsi d'ailleurs que la fécondité, rapportés par Vernon (1995) apparaissent particulièrement faibles (d'environ 4,5 % à 12,5 %) et laissent penser que les souches utilisées et/ou les techniques d'élevage sont peu performantes; les conclusions tirées des différents protocoles expérimentaux perdent en conséquence beaucoup de leur signification.

J'ai personnellement mesuré les taux d'éclosion dans différentes conditions. Chez des *B. glabrata* isolées, après autofécondation stricte, les pourcentages d'éclosion sont de 77,89 % chez les homozygotes pigmentées et 81,58 % chez les homozygotes albinos ($p < 0,001$) (Vianey-Liaud, 1989); chez les hétérozygotes, ce taux est de 78,4 % (Vianey-Liaud *et al.*, 1996). En allofécondation dominante, les taux d'éclosion sont plus faibles. Les descendants des hétérozygotes préalablement inséminées par un "mâle" albinos éclosent au taux de 67,6 %; dans le même type de croisement, les parents albinos inséminés par une partenaire hétérozygote produisent des oeufs dont 33,1 % sont abortifs (éclosion = 66,9 %) (Vianey-Liaud, *et al.*, 1996).

Au delà des taux d'éclosion, il est intéressant de connaître ou d'estimer le nombre de descendants (au moins potentiels) d un individu. A défaut de valeurs absolues réellement mesurées, on dispose d'estimations. Brumpt (1941) estime à environ 20000 les descendants d'une *B. glabrata*. Toujours à partir d'extrapolations, Ritchie, *et al.*(1966) sont moins optimistes et indiquent des nombres variant de plus de 10000 à moins de 14000. Mes propres estimations me font considérer ces dernières valeurs comme plus proches de la réalité.

## NOURRITURE, JEÛNE ET REPRODUCTION

### *Régime alimentaire*

L'influence de la nourriture sur la croissance et la reproduction d'une espèce est une étude classique qui a été largement développée chez *B. glabrata*:
- pour des raisons purement scientifiques,
- mais aussi pour savoir quelle nourriture doit être fournie au laboratoire aux animaux d élevage.

Un "bon" régime alimentaire doit pouvoir assurer, au laboratoire, une croissance et une fécondité optimales (Standen, 1951; Lagrange, 1957; Erickson *et al.*, 1961; Vieira et Senna, 1970). De nombreux régimes possibles ont été testés, et, bien qu'ils n'en disposent jamais dans la nature, les feuilles de laitue semblent être le mets le plus souvent proposé aux *B. glabrata* Facile à stocker à l époque où son coût est minimum, se conservant bien dans l'eau, la laitue permet de réaliser un bon compromis entre le développement et la reproduction des planorbes. L'ingestion et la présence de grains de sable dans l'estomac facilite l utilisation du matériel digestif (Boom-Ort, 1992) et stimule la croissance et la production d'oeufs (Schmölder et Becker, 1990).

La fourniture d un excès de nourriture réduit l'oviposition mais pas la production d'oeufs chez *L. stagnalis* (Van Der Steen, 1968); rien de tel n'a été démontré chez *B. glabrata*.

### *Jeûne*

Les effets du jeûne, privation totale de nourriture, sur le métabolisme, ont été l'objet de nombreuses études (cf. références *in*: Vianey-Liaud, 1984, Mat et Thomas, 1993) chez *B. glabrata* mais également chez d'autres planorbidés La reproduction de *B glabrata* est fortement affectée par l'absence de nourriture (von Brand *et al.*, 1957).

Les animaux immatures voient leur croissance arrêtée et ils n'atteignent pas la maturité sexuelle La spermatogenèse est limitée aux spermatogonies (alors que des spermatocytes I peuvent apparaître chez *B pfeifferi*). Le jeûne réduit significativement la production et la croissance ovocytaire. Une étude morphologique et pondérale montre que les tractus génitaux demeurent de type immature (Vianey-Liaud, 1984).

Chez les planorbes sexuellement mûres, spermatogonies et spermatocytes en prophase de méiose sont abondants, tandis que les stades ultérieurs ne sont présents qu'en faible nombre. Cette quasi disparition est due à l'action des cellules de Sertoli qui ne sont pas seulement "nourricières" au sens d Ancel (1903) mais également phagocytaires (Aubry, 1954, Joosse et Reitz, 1969, chez *L. stagnalis*, Barth et Jansen, 1960, de Jong-Brink *et al.*, 1977, chez *B. glabrata*). Après 25 jours de jeûne, ce qui semble être la limite physiologiquement supportable, le canal collecteur et le canal en "S" sont vides de spermatozoïdes, tandis qu ils demeurent présents dans les vésicules séminales. Les jeunes ovocytes sont abondants, les plus âgés sont rares et beaucoup d entre eux dégénèrent (Vianey-Liaud, 1973b). L'étude pondérale, histochimique et ultrastructurale des tractus génitaux des planorbes soumises au jeûne a été réalisée par de Jong-Brink (1973).

Les mécanismes métaboliques et neuro-hormonaux qui expliquent la diminution ou la suppression de l oviposition consécutive au jeûne ont été expérimentalement démontrés chez *L. stagnalis* (Veldhuijzen et Cuperus, 1976; Sheerboom, 1978, Elk et Joosse, 1981; Ter Maat *et al.*, 1982; Dogterom *et al* , 1984; Bayomy *et al.*, 1987). Particulièrement pour les processus neuro-hormonaux, à ma connaisance, aucune démonstration similaire n'a été apportée chez *B. glabrata*.

*Renutrition*

Quand le jeûne affectant les planorbes immatures cesse, les animaux privilégient leur effort de reproduction. En effet, la croissance corporelle reprend mais il subsiste par rapport aux témoins un déficit de taille et de poids respectivement de 10 % et 25 %. Au contraire, après avoir atteint la maturité sexuelle, la fécondité est statistiquement comparable à celle des témoins (Vianey-Liaud, 1984).

Chez les adultes, après blocage de l'oviposition, les pontes réapparaissent, progressivement de plus en plus nombreuses La première ponte réapparaît d'autant plus tôt que le jeûne préalable a été court (Vianey-Liaud, 1979b) Au contraire, quelle que soit la durée du jeûne, l'oviposition redémarre après un délai constant chez *L. stagnalis* (Joosse *et al.*, 1968, Dogterom *et al.*, 1984) ou après seulement 24 heures chez *Bulinus truncatus* (Bayomy *et al.*, 1987). Cette contradiction, particulièrement entre *B. glabrata* et *L. stagnalis*, est due à une action différente du jeûne chez les deux espèces:

- chez *B. glabrata*, les stades terminaux des deux gamétogenèses sont absents,
- chez *L. stagnalis*, tous les stades sont présents dans l'ovotestis

Dans ce domaine, comme dans bien d'autres, il serait dangereux de généraliser à tout un groupe les observations valables pour une espèce. Les phénomènes doivent être appréciés cas par cas, espèce par espèce.

*Jeûne intermittent*

Dans la plupart des travaux relatifs au jeûne, la privation de nourriture est totale et continue. Le jeûne peut cependant être intermittent, c'est à dire appliqué un nombre variable de jours (de 0 à 7) par semaine. Au bout de quatre semaines, on constate que les différentes durées n'entraînent pas de survie significativement différente. Il y a une corrélation négative significative entre la fécondité et la durée hebdomadaire du jeûne Après renutrition, les effets du jeûne intermittent préalable disparaissent au bout de deux semaines (Vianey-Liaud et Lancastre, 1994).

Ces résultats doivent attirer l'attention de tous ceux qui élèvent des *B. glabrata*. Un jeûne temporaire, même de faible durée (1 jour par semaine), entraîne des effets spectaculaires: diminution du nombre de pontes par animal et du nombre d'oeufs par animal de 56 % et 73 % respectivement. Sans précaution particulière, les week-end et les "ponts" pourraient biaiser gravement des résultats expérimentaux.

*Jeûne et mode de fécondation*

Les *B. glabrata* reçoivent du sperme lors de l'accouplement comme femelle. Ce sperme est-il affecté par le jeûne et peut-il être utilisé lorsque la nourriture est à nouveau disponible ?

Des planorbes sexuellement mûres et vierges ont été appariées durant 24 heures (Figure 9) puis soumises à des jeûnes de durée variable (de 0 à 20 jours); elles sont ensuite renourries (Vianey-Liaud et Dussart, 1994). Sur 80 planorbes albinos réellement soumises au jeûne (témoins exclus), 70 se reproduisent après renutrition par allofécondation en utilisant le sperme reçu et stocké avant l'expérience. Ce taux est voisin de ceux généralement observés dans diverses conditions expérimentales (Vianey-Liaud *et al.*, 1987, 1989, 1991). L'allosperme peut alors être utilisé durant une longue période (en moyenne 68,3 jours) et les nombres de pontes contenant des embryons hétérozygotes pigmentés ne sont pas corrélés à la durée du jeûne. Cependant, les effets du jeûne ne sont pas immédiats et des pontes contenant des embryons issus d'allofécondation sont déposées durant le jeûne, ce qui contribue à utiliser partiellement l'allosperme (Figure 10). L'ensemble des pontes contenant des embryons issus de fécondation croisée, pendant et après le jeûne, sont déposées en nombre statistiquement identique et pendant des durées indépendantes de celle du jeûne (Vianey-Liaud et Dussart, 1994).

Si le jeûne réduit ou supprime l'activité femelle (oviposition), il ne change pas le mode de fécondation, l'allofécondation restant dominante Le sperme reçu et non utilisé durant le jeûne est

peu affecté par celui-ci et peut retrouver une utilisation prioritaire après retour de conditions favorables.

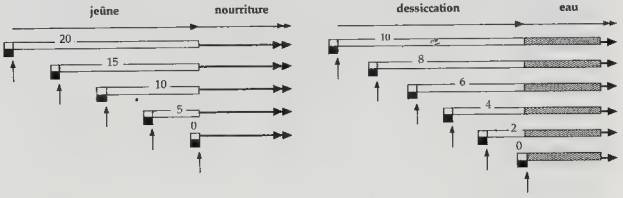



Figure 9 Jeûne et dessiccation de durée variable chez *B. glabrata*. Après séparation (flèches verticales) des partenaires pigmentée (carré sombre) et albinos (carré clair), l'analyse de la descendance de l'albinos permet de déterminer le mode de fécondation (auto- ou allo-fécondation). La durée du jeûne est exprimée en jours, celle de la dessiccation est exprimée en semaines.

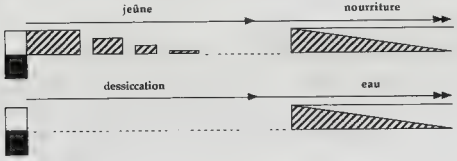



Figure 10 Utilisation de l'allosperme (zones hachurées) au cours et après le jeûne et la dessiccation chez *B. glabrata*.

## DESSICCATION ET REPRODUCTION

### *Résistance à la dessiccation*

Le jeûne total implique que les animaux soient maintenus dans de l'eau pure. Des précautions techniques imposent que soit prévenue toute prise de nourriture éventuelle due, soit à un développement de microalgues, soit à une coprophagie (Scheerboom et Geldof, 1978). Il s'agit de conditions qui ne peuvent exister qu'au laboratoire.

Bien que leur cycle puisse se dérouler intégralement dans l'eau, les *B. glabrata* peuvent également coloniser des habitats soumis à un dessèchement temporaire. La survie hors de l'eau est alors subie par les planorbes qui résistent, selon les conditions (rapidité du dessèchement, profondeur de l'enfouissement, humidité relative, etc...), plus ou moins longtemps à l'exondation; l'enfouissement est un moyen de résister à la dessiccation (Pieri *et al.*, 1980). Des survies supérieures à cinq mois ont pu être observées (Barbosa *et al.*, 1985) et peuvent même excéder un an (Dannemann et Pieri, 1993). Dans d'autres cas, au laboratoire et dans la nature, les *B. glabrata* peuvent être amenées à quitter spontanément l'eau et entrer en dormance (Richards, 1967a), probablement pour échapper à des conditions ressenties comme défavorables (Green *et al.*, 1992).

Durant l'exondation, la perte d'eau est importante. Même chez les individus adultes, si l'humidité relative est faible (de 0 à 65 %), la survie n'excède pas quelques jours (Vianey-Liaud et Lancastre, 1986b). Au contraire, en atmosphère saturée (Rh = 100 %), la survie est longue chez les adultes (Olivier, 1956; Olivier et Barbosa, 1956; von Brand *et al.*, 1957; Sturrock, 1970; de Jong-Brink, 1973; Vianey-Liaud et Lancastre, 1986b) et même chez les immatures (Vianey-Liaud et Lancastre, 1986a) où elle peut excéder six semaines. D'une façon générale la survie est très faible quant la perte de poids excède 50 % (Vianey-Liaud et Lancastre, 1986b).

Hors de l'eau, les *B. glabrata* sont profondément rétractées dans leur coquille et cessent toute prise de nourriture. La dessiccation implique donc, entre autres, une forte perte d'eau et un jeûne total. La survie durant la dessiccation est paradoxalement supérieure à celle observée durant le jeûne seul; il est vraisemblable que l'absence de mouvement durant la dessiccation limite les pertes d'énergie qui se poursuivent, bien qu'à un rythme progressivement décroissant, si les animaux jeûnent dans l'eau (von Brand *et al.*, 1957; Vianey-Liaud, 1984).

Dans les pontes exondées, le développement embryonnaire ne peut se poursuivre que pendant un temps limité (de quelques minutes à trois jours au maximum), qui est corrélé au taux d'humidité relative mais indépendant du stade de développement (Chernin et Adler, 1967).

***Blocage de la reproduction.***

Hors de l'eau, les *B. glabrata* ne pondent pas. Les conséquences de la dessiccation sur les tractus génitaux ont été étudiées par de Jong-Brink (1973). Aucune étude montrant d'éventuels effets sur la gonade n'a été menée.

***Retour à l'eau***

Après remise à l'eau, les animaux retrouvent leur activité en quelques heures au maximum et se nourrissent.

Chez les immatures, la croissance reprend mais le diamètre de la coquille et le poids frais total restent significativement inférieurs à ceux des témoins (Vianey-Liaud et Lancastre, 1986a). L'acquisition de la maturité sexuelle n'est pas significativement retardée. Les animaux préalablement soumis à la dessiccation privilégient ultérieurement leurs potentialités reproductrices (Vianey-Liaud et Lancastre, 1986a). S'il en est de même dans la nature, cela serait de nature à limiter les réductions démographiques consécutives à une exondation temporaire.

***Dessiccation et mode de reproduction***

L'oviposition cesse durant l'exondation et reprend après remise en eau. Si les planorbes sont isolées avant, pendant et après la dessiccation, la reproduction n'implique nécessairement que l'autofécondation.

Si les animaux ont été inséminés avant la dessiccation et ensuite isolés, la reprise de la ponte peut impliquer les deux modes de reproduction, auto- et allo-fécondation. L'allosperme reçu par la planorbe "femelle" survit-il pendant la période de dessiccation et est-il utilisable lors du retour à l'eau ? Ceci a été testé (Figure 9) chez des *B. glabrata* appariées durant 24 heures, soumises à dessiccation (Rh = 100 %) pendant une durée de 0 à 10 semaines puis remises en eau et isolées pour prévenir une nouvelle insémination (Vianey-Liaud et Dussart, 1994).

La survie hors de l'eau est inversement proportionnelle à la durée de la dessiccation, encore importante après huit semaines (14/20), faible au delà (4/20). La durée séparant la remise en eau de la réapparition de l'oviposition est proportionnelle à la durée de la dessiccation. Parmi les planorbes ayant réellement subi la dessiccation (hors témoins), 76,1 % ont recours à la fécondation croisée et utilisent l'allosperme reçu avant la dessiccation (Figure 10). Les temps nécessaires pour épuiser totalement le stock d'allosperme, les nombres de pontes contenant des embryons issus d'allofécondation, sont négativement corrélés à la durée de l'exondation préalable (Vianey-Liaud et Dussart, 1994).

Il reste que la dessiccation, même prolongée n'empêche pas une majorité de *B. glabrata* d'utiliser ultérieurement, de préférence, l'allosperme.

Le recours à l'autofécondation a été souvent présenté comme permettant à un animal qui se retrouverait isolé après dessiccation et effondrement drastique de l'effectif de la population, de reconstituer à lui seul une nouvelle population. Cette tentative, séduisante, d'explication, n'est cependant pas satisfaisante. Si l'individu survivant a été inséminé avant l'exondation, et on imagine mal que ça ne soit pas le cas au sein d'une population où les individus sont nombreux, il peut dans la majorité des cas utiliser l'allosperme lorsque les conditions redeviennent favorables. La période de dessiccation apparaît alors comme une sorte de parenthèse qui suspend temporairement la reproduction, sans en changer fondamentalement la nature ultérieure.

## LA TEMPÉRATURE

Tous les auteurs s'accordent pour constater que chez les Basommatophores une température élevée accélère la croissance corporelle tandis que la fécondité diminue (Schalie et Berry, 1973; cf. références *in* Appleton, 1978; Barbosa *et al*, 1987). Chez le seul genre *Biomphalaria*, il a été montré que la température qui permet d'obtenir une fécondité maximum est inférieure à celle permettant d'obtenir une croissance maximum (Michelson, 1961; Sturrock et Sturrock, 1972; Graber *et al*, 1977; Vianey-Liaud, 1982).

Il est possible de tester les préférences des animaux dans un gradient thermique, ceux-ci choisissant une température de 28°C (Chernin, 1967); ces préférences sont abaissées chez les souches résistantes et sensibles après exposition aux miracidiums de *S. mansoni* (Lefcort et Bayne, 1991). Cependant, pour des raisons techniques liées à la simplicité de l'appareillage nécessaire, c'est en général une température constante qui est retenue. Dans les élevages, le nécessaire compromis entre croissance et reproduction amène les auteurs à retenir en général une température de 25°C. Une courte revue bibliographique confirme la pertinence de ce choix (Pimentel-Souza *et al.*, 1990).

Si une température élevée (égale ou supérieure à 30°C) réduit ou bloque la reproduction, peu d informations sont disponibles quant aux effets sur l'appareil génital (Michelson, 1961; Vianey-Liaud, 1981, 1982). De mes propres observations, il ressort que:

- une température de 30°C réduit la fécondité mais ne stérilise pas les animaux,
- une température de 33°C stérilise les adultes et bloque l'apparition de la maturité sexuelle chez les planorbes préalablement immatures,
- les nombres d'ovocytes et leurs diamètres moyens ne diffèrent pas à 25°C et 33°C,
- les tractus génitaux ne régressent pas chez les adultes et se développent chez les immatures.

Si une température élevée réduit (30°C) ou bloque (33°C) l'apparition de la maturité sexuelle, le développement de l'appareil génital (ovotestis et tractus) n'est pas sensiblement perturbé. Ceci explique qu'après retour à 25°C, la reprise de l activité sexuelle est très rapide (quelques jours).

L'action inhibitrice d'une température élevée ne s'exerce manifestement pas directement sur l'appareil génital. Par analogie avec les informations acquises chez d'autres Basommatophores, il est vraisemblable qu'il y a un relai passant par le système neuro-endocrine, au niveau du système nerveux central (Lever *et al.*, 1965, Saleuddin *et al*, 1982, Joosse et Geraerts, 1983). Cela reste cependant totalement hypothétique chez *B. glabrata*.

En ce qui concerne le développement embryonnaire, sa vitesse est corrélée à la température mais il est normal pour des températures inférieures à 35°C. Une exposition de 83 à 100 heures à 35°C empêche l'éclosion des embryons qui sont bloqués aux stades pré- ou post-gastrula (Siefker *et al.*, 1977).

## LES ÉCHANGES GÉNÉTIQUES

### *L'albinisme utilisé comme marqueur génétique*

L'albinisme a été très tôt signalé chez les Mollusques (cf. références *in:* Locard, 1883) et plus particulièrement chez les planorbidés *P. corneus* (Locard, 1883; Oldham, 1928), *B. truncatus* (Larambergue, 1937, 1939), *B. tenagophila* et *P. banaticus* (Beriozkina et Starobogatov, 1995). L'utilisation, chez les bulins, des marqueurs pigmentaires pour l'analyse des phénomènes de fécondation a été proposée par Larambergue (1937). Chez *B. glabrata*, Newton (1954) a montré que l'albinisme était contrôlé par un simple caractère Mendélien récessif. Combiné à une haute réceptivité à l'infestation par *S. mansoni*, l'albinisme permet de suivre *in vivo* le développement du parasite (Newton, 1955).

Paraense (1955) jeta les bases d'une méthode permettant de déterminer si la descendance produite par une "femelle" albinos inséminée par un "mâle" pigmenté, était issue d'autofécondation ou d'une fécondation croisée (Figure 11). Cette méthode sera précisée par Richards (1967b, 1969, 1973) qui a montré que la pigmentation de base était contrôlée par trois allèles codominants: C > Cb > c. La présence, à l'état homozygote ou hétérozygote des allèles C ou Cb entraîne une pigmentation noire des yeux qui peut être détectée dès le 5ème ou le 6ème jour du développement embryonnaire.

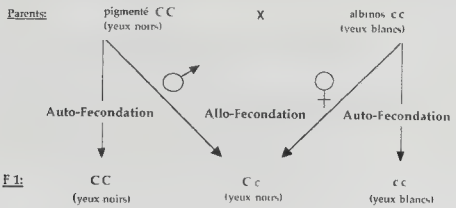



Figure 11. Modes de fécondation chez *B. glabrata*. S'il s'est accouplé comme "femelle", la descendance du parent albinos peut être analysée en première génération (d'après Paraense, 1955).

Dans le cas d'un couple de parents homozygotes CC (pigmenté) et cc (albinos), l'analyse ne peut se faire, en première génération, que sur la descendance du parent albinos s'il s'est comporté comme "femelle" (Figure 11). L'analyse de la descendance du parent pigmenté "mâle" ne peut être réalisée qu'en deuxième génération, après autofécondation ou back-cross. Il en est de même si le parent albinos se comporte comme mâle. En dépit de ces restrictions, la méthode de Paraense (1955) est simple, rapide, peu coûteuse et applicable à de nombreuses situations expérimentales.

### *Appariement, accouplement et utilisation de l'allosperme*

Lorsque des *B. glabrata* sexuellement mûres et vierges sont appariées, elles copulent rapidement, généralement au bout d'une demi heure. Si elle est alors isolée, la planorbe "femelle", qui a reçu du sperme (allosperme) de sa partenaire, dispose de deux spermes aptes à féconder ses ovocytes:

- l'autosperme stocké dans les vésicules séminales,
- l'allosperme, qui migre jusqu'à l'ovotestis (Paraense, 1976).

Si les parents sont des homozygotes CC (pigmenté) et cc (albinos), la descendance de la "femelle" albinos peut être analysée et permettre de distinguer les individus de première génération issus d'auto- ou allo-fécondation (Figure 11). Il est ainsi prouvé que:

- l'autofécondation cesse immédiatement après l'insémination,
- les premières pontes déposées contiennent exclusivement des embryons issus d allofécondation,
- après quelques jours, l'autofécondation réapparaît, à un taux progressivement croissant,
- pendant une durée variable (de quelques semaines à plusieurs mois), autofécondation (utilisation de l'autosperme) et allofécondation (utilisation de l'allosperme) sont simultanées et des embryons issus des deux modes de fécondation coexistent dans les pontes,
- s il n'y a pas de nouvelle insémination, l'autofécondation est finalement restaurée et redevient l'unique mode de fécondation (Figure 12).

Figure 12. Utilisation progressive de l'allosperme par une "femelle" albinos "cc" préalablement inséminée par un "mâle" pigmenté "CC" chez *B. glabrata*. Les cercles noirs représentent les embryons pigmentés "Cc" issus de fécondation croisée, les cercles blancs representent les embryons albinos "cc" issus d autofécondation. Les oeufs, sécrétés par la glande de l'albumine, ne sont pas figurés.

***Durée de l'appariement et utilisation de l'allosperme***

Des couples de *B. glabrata* homozygotes vierges et mûres, pigmentées CC et albinos cc, peuvent être réunies pendant des durées variant de 1 à 20 jours (Vianey-Liaud *et al.*, 1989). Après l'appariement, les partenaires sont séparées et la descendance (F 1) des planorbes albinos est analysée jusqu'à épuisement complet de l'allosperme éventuellement reçu lors d'un (ou plusieurs) accouplement(s). L'analyse de la descendance des *B. glabrata* albinos montre que 77,5 % de ces parents produisent une descendance pigmentée (après allofécondation).

Chez les planorbes qui utilisent l'allosperme, la durée de cette utilisation est corrélée négativement avec la durée de l'appariement et, paradoxalement, plus l'appariement est court, plus l'utilisation de l'allosperme est longue En fait, l'utilisation de l'allosperme démarre réellement dès le début de l'appariement; aux durées observées après séparation des copulants, il convient d'ajouter la durée de l'appariement. Les durées totales sont alors remarquablement voisines pour six des huit durées (de 54,7 à 55,5 jours) et ne diffèrent pas statistiquement (Vianey-Liaud *et al.*, 1989).

Si la durée d'utilisation de l'allosperme est hée à la quantité de sperme reçu, donc au nombre d'accouplements, il est probable qu'ici leur nombre n est pas lié à la durée de l'appariement. Il serait nécessaire d'avoir plus d'information sur les séquences d'accouplements successifs au sein de couples non renouvelés. Une des difficultés rencontrées est due au fait que les planorbes peuvent s'accoupler comme mâle et comme femelle. Les accouplements successifs ont été étudiés chez *L. stagnalis* (Duivenboden et Ter Maat, 1985) mais rien n indique que ces résultats soient généralisables à *B glabrata* chez qui des études sont en cours et devraient apporter des éléments d'explication.

***Appariement avec des partenaires successives***

Une planorbe est-elle capable d'inséminer successivement des partenaires différentes et, si oui, l'utilisation de l'allosperme reçu varie-t-elle selon l'ordre dans la succession ?

Il a été constitué des couples successifs impliquant un même individu homozygote pigmenté CC et 20 partenaires albinos cc mûres et vierges (Figure 13). Chaque couple était réuni durant 24 heures puis les albinos isolées et leur descendance étudiée. Douze séries expérimentales ont été constituées,

impliquant donc 12 homozygotes pigmentées et 240 albinos. L'étude de la F 1 produite par les parents albinos a porté sur un total de 12499 pontes (Vianey-Liaud *et al*, 1991). Parmi les 240 albinos, 87,5 % produisent une descendance pigmentée après allofécondation.

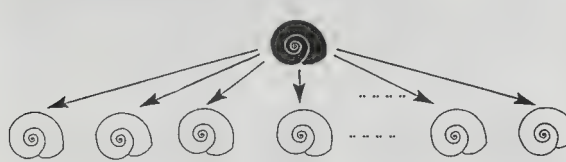



Figure 13 Appariements (durée 24 heures) successifs d'une *Biomphalaria glabrata* pigmentée CC (profil noir) avec des partenaires albinos cc (profil blanc) durant 20 jours.

Deux des 12 *B. glabrata* sont capables de s'accoupler et d'inséminer leurs 20 partenaires disponibles et, pour les 12 séries expérimentales, le taux d'albinos ayant subi la fécondation croisée varie de 70 à 100 %. Les albinos qui se sont reproduites par autofécondation sont aptes (lors d'autres appariements avec d'autres partenaires) à être inséminées; les interruptions observées sont donc dues à une incapacité temporaire de la partenaire pigmentée.

Dans des expériences similaires, Rudolph (1983) observait que les *Bulinus globosus* pouvaient inséminer 60 % de leurs partenaires successifs. Cependant la physiologie des *B. glabrata* diffère de celle des *B. globosus* chez qui une éjaculation suffit pour vidanger complètement les vésicules séminales, le stock de spermatozoïdes n'étant reconstitué qu'après une dizaine de jours. Je n'ai pour ma part jamais observé de vésicules séminales complètement vidangées et je pense plutôt que la *B. glabrata* ne transfère à chaque partenaire successive qu'une partie limitée de ses spermatozoïdes; cette quantité peut être très différente pour les divers partenaires, ainsi qu'en témoigne la grande variabilité des durées d'utilisation observées: de 3 à 147 jours, et des nombres de pontes contenant des embryons issus d'allofécondation: de 1 à 118 (Vianey-Liaud *et al.*, 1991).

***Appariement avec un nombre variable de partenaires***

L'appariement de deux planorbes est le plus souvent suivi de fécondations croisées. Lorsque le nombre d'individus réunis est supérieur à deux, une planorbe devrait pouvoir, théoriquement, inséminer plusieurs partenaires.

J'ai donc réuni une planorbe pigmentée CC avec un nombre variable d'albinos cc, pendant 1 à 20 jours; la durée des appariements était proportionnelle au nombre de partenaires (Vianey-Liaud *et al.*, 1987). L'expérience a porté au total sur 50 pigmentées et 370 albinos dont la descendance (10063 pontes) a été analysée. Parmi les 370 albinos, 56 % ont produit une descendance pigmentée après utilisation de l'allosperme transféré par la pigmentée. Quand le nombre de partenaires albinos augmente de 1 à 20,

- le pourcentage d'albinos produisant des embryons pigmentés décroît linéairement de 80 % à 44 %
- la durée moyenne d'utilisation de l'allosperme (50,1 ± 2,1 jours) montre une grande variabilité (de 3 à 127 jours, ) et décroît linéairement (Vianey-Liaud *et al.*, 1987).

Lorsque des couples sont expérimentalement constitués, les partenaires s'accouplent comme mâle ou comme femelle, avec le seul individu disponible. Au sein de groupes plus nombreux, des copulations peuvent intervenir entre tous les individus réunis. Cela limite les possibilités pour un

individu, même si la durée de la mise en présence est proportionnelle au nombre d'individus, de féconder toutes les partenaires potentiellement inséminables.

Dans le schéma expérimental retenu (le seul pratiquement analysable), un seul individu pigmenté mis en présence de 20 partenaires albinos possibles, féconde néanmoins 44 % d'entre elles (51,8 % si on ne tient compte que des partenaires vivantes et fertiles). L'activité "mâle" d'une *B. glabrata* reste donc importante même si l'effectif du groupe augmente.

On peut remarquer que si la méthode retenue, directement dérivée de celle de Paraense (1955) est performante et permet une analyse relativement facile des résultats, elle montre aussi ses limites. La descendance uniquement albinos des 134 planorbes non inséminées par les pigmentées, peut être issue, soit d'autofécondation, soit d'allofécondation par une (ou des) partenaire(s) elle(s)-même(s) albinos; de même, la présence d'embryons albinos dans des pontes contenant par ailleurs des embryons pigmentés n'implique pas nécessairement un retour à l'autofécondation; ils peuvent aussi, sans qu'on puisse le détecter, être issus d'allofécondations consécutives à une ou plusieurs inséminations dues, à des partenaires albinos. L'utilisation de l albinisme comme marqueur génétique pour l'analyse de la descendance de la "femelle" d'un couple reste une méthode de choix; elle se révèle insuffisante pour des groupes. On verra dans la discussion quels pourraient être les apports de la biologie moléculaire.

***Plusieurs spermes disponibles, lequel choisir ?***

Il est définitivement établi qu'une planorbe qui a reçu de l'allosperme d'une partenaire, utilise le plus souvent celui-ci, de préférence à son propre autosperme. Mise en présence de plusieurs partenaires successives, l'animal peut disposer, outre son autosperme, de plusieurs allospermes. Parmi les diverses hypothèses possibles, on peut, théoriquement, s'attendre soit à une utilisation du premier ou du dernier allosperme reçu, soit à une utilisation simultanée des allospermes.

Des planorbes albinos (Alb.) ont été appariées 24 heures à des partenaires de même génotype puis isolées. Après des délais variant de 0 à 10 jours, les deux partenaires ont été appariées à des planorbes homozygotes pigmentées (Pig.) puis isolées et leur descendance a été analysée (Vianey-Liaud, 1995). Parmi les 100 planorbes Alb., 85 d'entre elles utilisent l'allosperme reçu de l'individu Pig. lors de l'accouplement le plus récent. Les délais qui séparent les deux appariements ne changent pas les proportions respectives de celles utilisant le dernier allosperme et de celles (15 %) produisant une descendance exclusivement albinos.

Dans l'expérience inverse, des *B. glabrata* albinos (Alb.1) ont été appariées à des partenaires Pig. durant 24 heures, puis, après 0 à 10 jours, elles ont été appariées à des albinos (Alb.2) durant 24 heures et isolées. La descendance des Alb.1 et des Alb.2 a été analysée. Aucune des 80 Alb.2 n'a produit de descendance pigmentée. Au contraire, 78/80 (= 97,5 %) des Alb.1 produisent une descendance pigmentée et utilisent donc de préférence le premier allosperme reçu. Des expériences complémentaires ont été réalisées; les données numériques obtenues (Vianey-Liaud, 1995) confirment les présents résultats.

Les données, contradictoires, qui viennent d'être présentées pourraient s'expliquer par:

- une absence d'accouplement entre les individus albinos; l'observation directe des animaux appariés conduit à rejeter cette explication,

- une préférence (comportementale, physiologique, .. ) de la souche albinos pour des individus pigmentés. Les deux principales séries d'expériences rapportées plus haut ont été répétées avec une nouvelle souche d'albinos portoricaine cultivée jusqu'alors en Allemagne par Claus Meier-Brook. Les résultats obtenus avec cette nouvelle souche furent similaires. Les *B. glabrata* albinos utilisent de préférence le sperme issu d'un individu pigmenté, que ce sperme soit le premier ou le dernier reçu.

J'ai alors émis l'hypothèse d'une compétition spermique: les spermatozoïdes transférés par une *B. glabrata* pigmentée seraient utilisés de préférence à ceux transférés par une planorbe albinos (et bien sûr, comme précédemment, de préférence aux (auto-)spermatozoïdes produits par le receveur (Vianey-Liaud, 1995). Il convenait d'étayer cette hypothèse.

*Compétition spermique*

Dans les expériences précédentes, la production d'une descendance albinos par des parents albinos pouvait être due:

- soit à une compétition entre allospermes, dont celui produit par les pigmentées sortirait vainqueur,
- soit à un retour à l'utilisation de l'autosperme (ou à son utilisation exclusive dans 15 % (première expérience) ou 2,5 % (deuxième expérience) des cas.

Pour trancher, il fallait que les spermatozoïdes porteurs des allèles C et c soient potentiellement utilisables avec une probabilité équivalente. Ceci a pu être testé en étudiant la descendance, en autofécondation exclusive, de *B. glabrata* hétérozygotes Cc. A partir de 20 hétérozygotes, on obtient au bout de quatre semaines 78,4 % de pigmentées et 21,6 % d'albinos, l'écart par rapport aux proportions Mendéliennes théoriques étant hautement significatif (Vianey-Liaud *et al.*, 1996).

Les écarts observés peuvent être dûs aux spermatozoïdes porteurs de C ou c mais aussi aux ovocytes porteurs des mêmes allèles. Lorsque les hétérozygotes sont appariées à des albinos, leur descendance durant 17 jours (période de l'utilisation maximum de l'allosperme) ne s'écarte pas significativement des proportions théoriques Mendéliennes 1/2 pigmentée, 1/2 albinos. Ce ne sont donc pas les ovocytes qui expliquent les résultats précédents mais bel et bien les spermatozoïdes. Au-delà du 17ème jour, avec le retour progressif à l'autofécondation, le pourcentage de pigmentées augmente fortement.

Dans le même type de croisement (Cc x cc), les albinos, du 2ème au 20ème jour produisent une descendance dans laquelle il y a un excès significatif de pigmentées. Ensuite, le retour à l'utilisation de l'autosperme, où ne sont présents que les allèles c, masque cette compétition (Vianey-Liaud *et al.*, 1996).

Parmi les causes qui pourraient expliquer la compétition, une explication classique concerne une possible différence de vitesse de déplacement des spermatozoïdes, positivement corrélée à leur longueur. Une étude a porté sur la longueur des spermatozoïdes (autosperme) prélevés dans les vésicules séminales de planorbes homozygotes Pig. et Alb. 1250 spermatozoïdes ont été mesurés pour chaque souche. Chez les Pig. et les Alb., les moyennes respectives sont ($m \pm s.e.$) $0,625 \pm 0,0007$ et $0,617 \pm 0,0007$ mm ($p < 0,0001$) (Vianey-Liaud *et al.*, 1996) Néanmoins les distributions des longueurs montrent une très grande variabilité et même s'il existe une différence entre les moyennes, il est peu probable que cela puisse expliquer l'utilisation préférentielle des spermatozoïdes porteurs de l'allèle C. Actuellement, aucune explication de ce phénomène, pourtant indiscutable, ne peut être avancée de façon convaincante.

La compétition spermique, quelles qu'en soient les causes, est indiscutablement liée à la pigmentation Rien n'indique pourtant que les allèles responsables de la pigmentation interviennent dans son contrôle. La compétition peut avoir un déterminisme complexe, indépendant de la pigmentation, les caractères la contrôlant ayant simplement été sélectionnés au cours des cultures des souches Pig. et Alb. Il a pu d'ailleurs être démontré que les souches ont des traits de vie différents quant au comportement vis a vis de la lumière (Schall *et al.*, 1985), à la croissance et la fécondité (Scherrer *et al.*, 1976; Vianey-Liaud, 1989).

*Partage du sperme*

Monteiro *et al.* (1984) montrent qu'une planorbe Pig. (– donneur), en copulant comme mâle, transmet son sperme à une partenaire Alb. qui utilise cet allosperme et produit une descendance hétérozygote pigmentée (tous les expérimentateurs ayant travaillé sur les Basommatophores s accordent certainement sur cette réalité). Le point original était que cette première Alb. (= intermédiaire) pouvait à son tour transmettre cet allosperme à une nouvelle Alb. (= receveur) qui elle aussi, en l'absence de tout appariement avec une Pig., produisait une descendance pigmentée.

L'article de Monteiro *et al.* (1984) fut l'objet d'un débat finalement assez dur, où intervenaient Paraense (1987), Monteiro (1987) et Leonard et Lukowiak (1987).

Personnellement très étonné des résultats de Monteiro *et al.* (1984), j'avais rapidement tenté, sans succès, de les reproduire (Vianey-Liaud, 1990). Par ailleurs, une des deux expériences rapportées précédemment (Vianey-Liaud, 1995) reproduisait le dispositif expérimental de Monteiro *et al.* (1984): Pig. = donneur; Alb.1 = intermédiaire, Alb.2 = receveur. Les 80 *B. glabrata* (= Alb.2) étudiées pendant 28 jours déposèrent 1982 pontes contenant au total 33392 embryons dont aucun n'était pigmenté.

Ces résultats, c'est un euphémisme, s'accordent mal avec la "nouvelle stratégie comportementale" et l'allosperme de *B. glabrata* semble, dans les faits, bien peu partagé. Il est pour le moins surprenant que ni Paraense (1987) ni moi-même à deux reprises, n'ayons pu obtenir expérimentalement chez *B. glabrata* des résultats permettant de conclure à un quelconque partage. Rollinson *et al.* (1989) ont également échoué dans leur tentative de démonstration chez *Bulinus cernicus*. Bien avant que l'hypothèse d'un partage du sperme soit émise, il en avait été de même chez *L. stagnalis* (Cain, 1956).

Le débat reste donc ouvert, même si aujourd'hui la notion de partage du sperme doit être manipulée avec réserves. La publication en cause date de 1984. Hormis le débat de 1987, et c'est peut-être le plus inquiétant, les auteurs eux-mêmes n'ont jamais confirmé, affiné ou généralisé leurs résultats. J'aurais donc personnellement tendance à penser que, chez *B. glabrata* et probablement chez les Basommatophores, le partage du sperme est peu vraisemblable. Chaque jour qui passe renforce cette conviction et il est fort possible qu'à terme, cette "nouvelle stratégie comportementale", pourtant annoncée dans une revue à fort *"impact factor"* disparaisse légitimement de la littérature scientifique.

***Des hermaphrodites qui deviennent des mâles***

On a vu précédemment que la castration chirurgicale est techniquement possible chez *B. glabrata*, que la survie peut être très longue (Vianey-Liaud, 1972) et que les individus castrés s'accouplent selon les mêmes modalités que les témoins (Vianey-Liaud, 1992). Rappelons qu'une *B. glabrata* castrée isolée dépose des pontes stériles (Figure 4).

Si cette planorbe castrée s'accouple comme "femelle", elle reçoit de l'allosperme qui ne peut être utilisé, faute d'ovocytes à féconder; cet allosperme est définitivement perdu. Au contraire, la planorbe castrée ne produit bien sûr plus d'autosperme mais elle en possède encore, stocké dans les vésicules séminales. La méthode de Paraense (1955) peut alors être utilisée, les parents impliqués étant un individu pigmenté CC castré et un individu albinos cc (Figure 14). L'analyse de la descendance de la planorbe albinos qui s'est comportée comme "femelle" (la castrée comme "mâle") montre que (Vianey-Liaud, 1992):

- les planorbes castrées peuvent s'accoupler comme "mâle",
- l'autosperme peut être tranféré entre deux et cinq semaines après la castration,
- l'utilisation du sperme transféré (allosperme) est relativement plus courte qu'entre partenaires normaux, mais sa conservation est néanmoins meilleure chez le receveur ( femelle") que chez le donneur ("mâle").

Une planorbe hermaphrodite simultanée, après castration post-pubérale, perd immédiatement et définitivement sa fonction femelle mais elle fonctionne encore temporairement comme "mâle". La cessation de la fonction mâle peut être due soit à l'épuisement du stock de spermatozoïdes, soit à la perte de leur pouvoir fécondant. Même si, à terme, ils disparaissent définitivement, la présence de spermatozoïdes dans les vésicules séminales plusieurs mois après la castration (Vianey-Liaud, 1972) laisse penser que la deuxième explication est la plus vraisemblable.

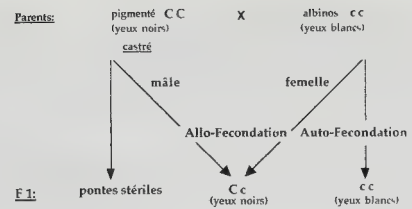



Figure 14 Modes de fécondation après castration post-pubérale totale d'une *B. glabrata*. Le parent castré produit des pontes stériles. S'il s'accouple comme "mâle", le parent pigmenté castré peut inséminer une partenaire albinos dont l'origine de la descendance (autofécondation ou fécondation croisée) peut être analysée en première génération. Si cette planorbe castrée s'accouple comme "femelle" et reçoit du sperme d'une partenaire albinos, elle ne peut utiliser l'allosperme et ne dépose que des pontes stériles (absence d'embryon).

## PARASITISME ET REPRODUCTION

Il serait sans doute très imprudent, et sans doute impossible, de prétendre fournir au lecteur une liste complète des références portant sur les relations entre l'infestation parasitaire et la reproduction des *B. glabrata*. Je donnerai néanmoins quelques pistes et quelques références permettant de reconstituer une large bibliographie sur ce sujet.

### *Infestation par les stades larvaires de* Schistosoma mansoni

Les *B. glabrata* exposées aux miracidiums de *S. mansoni* montrent, à court terme, un accroissement de l'effort de reproduction (Minchella et Loverde, 1981; Thornhill *et al.*, 1986). L'infestation précoce inhibe le développement des organes sexuels accessoires; la croissance de l'ovotestis ne diffère pas de celle des témoins durant la période prépatente mais est ralentie durant la période patente (Gérard, 1993). Infestées peu de temps après l'éclosion, un pourcentage parfois élevé de *B. glabrata* émettront ultérieurement des cercaires et produiront simultanément des oeufs (Cooper *et al.*, 1992).

Néanmoins, globalement, l'infestation par les miracidiums et le développement des stades larvaires de *S. mansoni* réduiront l'effort de reproduction des *B. glabrata* (Brumpt, 1941; Coelho, 1954 (cité par Golvan *et al.*, 1975); Pan, 1965; Etges et Gresso, 1965; Sturrock et Sturrock, 1970a; Etges *et al.*, 1975; Looker et Etges, 1979, Meier et Meier-Brook, 1981; Crews et Yoshino, 1989, 1990; Gérard, 1993; Cooper *et al.*, 1994).

### *Autres parasites*

En raison de son rôle dans la pathologie humaine, l'attention des chercheurs s'est, légitimement, souvent focalisée sur *S. mansoni*. Cette espèce n'est pourtant pas la seule à parasiter *B. glabrata*.

Sur un territoire aussi réduit que la Guadeloupe (Antilles françaises), Nassi (1990) relève, outre *S. mansoni*, neuf espèces de Trématodes dont les stades larvaires infestent *B. glabrata*. Plusieurs de ces parasites se révèlent être des espèces castrantes pour leur hôte intermédiaire (Golvan *et al.*, 1974, 1975). Les modalités de cette castration varient avec les espèces (Nassi, 1988, 1990; Nassi et Dupouy, 1988; Dupouy *et al.*, 1992).

- trois castrateurs à rédies sont des castrateurs obligatoires qui provoquent un arrêt complet de l'oviposition: *Ribeiroia marini* et *Echinostoma parvocirrus* qui castrent au stade rédie-mère, ainsi que *Petasiger carribensis*,

- deux espèces sont des castrateurs facultatifs: l'une au stade rédie-fille, *Clinostomum golvani*, l'hôte déposant ou non des pontes qui peuvent alors être fertiles ou stériles, l'autre au stade sporocyste cercariogène, *Apatemon gracilliformis*, la castration dépendant de la charge parasitaire.

Le castrateur détourne une partie de l'énergie que l'hôte consacre à sa reproduction. Cette consommation s'intensifie quand les larves se multiplient au contact de l'appareil génital, notamment de l'ovotestis (Dupouy *et al.*, 1992).

Le détail de l'action du parasite a été précisé pour le couple *B. glabrata*/*R. marini* (Nassi, 1979, 1982, 1990). Les rédies sont essentiellement hémocytophages, accessoirement germinophages; elles provoquent une vidange des acini ( à l'exception des jeunes ovocytes qui restent accolés à la paroi), les cellules germinales étant ultérieurement phagocytées par l'épithélium de la paroi des vésicules séminales (Nassi *et al.*, 1986).

Le blocage de l'oviposition n'est pas dû aux modifications affectant la gonade. Quelques rédies mères colonisant le tissu sanguin proche de la commissure sus-oesophagienne suffisent pour bloquer la ponte (Nassi, 1979, 1982). Le parasite se révèle en outre plus efficace pour stériliser l'hôte que l'expérimentateur qui supprime chirurgicalement l'ovotestis (Vianey-Liaud, 1972, 1979). Parasite et chercheur suppriment la reproduction de l'hôte. En agissant en amont du système de contrôle, le parasite empêche aussi le dépôt de pseudo-pontes stériles; l'énergie ainsi économisée n'est pas investie dans une croisssance somatique inhabituelle de l'hôte (Dupouy *et al.*, 1992). Cette stratégie est plus profitable au parasite qu'à l'hôte. L'action castratrice de certains Trématodes, particulièrement celle de *Ribeiroia marini guadeloupensis* a pu être utilisée pour réduire drastiquement des populations de Mollusque hôte (Nassi, 1978, Nassi *et al.*, 1978).

Des Microsporidies peuvent aussi infester les *B. glabrata*. D'éventuels effets sur la reproduction de l'hôte n'ont pas été signalés (Bayne *et al.*, 1975).

## DISCUSSION

Suivant en cela l'évolution des techniques, notre connaissance de *B. glabrata*, et plus généralement du genre *Biomphalaria*, a été progressivement acquise à partir d'études morphologiques *s.l.*, physiologiques et génétiques.

La définition des caractères spécifiques a souvent été basée sur l'étude de la coquille et de l'appareil génital (Paraense et Deslandes, 1955b; Paraense, 1961a; Mello, 1972; Paraense, 1975), même si d'autres caractères ont pu être pris en compte (Paraense et Deslandes, 1955b, 1959). La coquille, les parties distales des tractus génitaux (spermathèque = glande gamétolytique et pénis), l'hémolymphe, mais aussi le comportement et l'estivation, montrent une variabilité intraspécifique (Richards et Ferguson, 1965; Gilbertson *et al.*, 1967; Michelson et Dubois, 1975; Pieri et Thomas, 1986).

*Biomphalaria glabrata* est un hermaphrodite simultané, potentiellement autofécond, qui pratique néanmoins communément la fécondation croisée. L'incompatibilité sexuelle peut donc être utilisée pour distinguer les espèces (Paraense et Deslandes, 1955a). Cependant, des populations éloignées peuvent présenter une incompatibilité sexuelle partielle; cet isolement partiel est dissymétrique, fort si le "mâle" est septentrional et la "femelle" méridionale, faible dans le cas inverse (Paraense, 1956, 1959). Les individus de certaines souches (ex. souche Z, Brésil) se reproduisent par autofécondation ou par fécondation croisée en présence de partenaires de même souche; après appariement avec des partenaires d'autres souches, ils produisent des pontes déformées ou ne pratiquent que l'autofécondation. De même, la souche DR (République Dominicaine) apparaît sexuellement incompatible avec la plupart des autres souches (Mulvey et Vrijenhoek, 1984).

La connaissance, sans cesse améliorée, des genres et des espèces, permet de disposer d'éléments synthétiques concernant la biogéographie (Meier-Brook, 1984) et la phylogénie des Planorbidae (Hubendick, 1955, Jung, 1992) ou du seul genre *Biomphalaria* (Bandoni *et al.*, 1995). La définition de nouvelles espèces ou la distinction entre espèces proches a fortement progressé avec l'utilisation d'outils moléculaires: Mello et Paraense (1978), Henriksen et Jelnes (1980), Jelnes (1982a, 1982b), Jelnes et Pointier (1985), Bailey *et al.*, (1986), Paraense *et al.*, (1992), Mascara et Morgante (1991, 1995), Rodriges Pires *et al.*, (1997).

Chez *B. glabrata*, la morphologie et l'anatomie microscopique de l'appareil génital a été clairement décrite, au moins en ce qui concerne les individus sexuellement actifs.

Le développement embryonnaire est assez bien connu (Camey et Verdonk, 1970; Kawano *et al.*, 1992). Par analogie avec les informations obtenues chez d'autres Basommatophores (Fraser, 1946; Brisson et Regondaud, 1971, 1977) et chez les Mollusques en général (Tardy, 1970), l'origine de la gonade est probablement mésodermique et celle des tractus génitaux ectodermique.

Le développement post-embryonnaire de l'appareil génital n'est connu qu'à travers des études planimétriques ou volumétriques. Il reste à réaliser une étude chronologique du développement de la gonade et des tractus. Comme cela a pu être fait chez *Stagnicola elodes* (Rudolph, 1980), cela permettrait peut être d'établir, chez *B. glabrata*, une synchronisation entre l'apparition des cellules sexuelles et le déclenchement des processus de sécrétion dans les portions glandulaires des tractus génitaux. Une telle étude, qui ne nécessite dans un premier temps, que le recours à la microscopie photonique, n'est malheureusement pas "à la mode"; je souhaite, sans trop d'espoir, être démenti.

La présence dans l'appareil génital de spermatozoïdes mûrs avant les ovocytes était connue. Le caractère fonctionnel d'une courte phase protandre n'a pourtant été démontré que très récemment (Trigwell et Dussart, 1998). Bien que toujours inférieure à deux semaines, cette phase protandre doit maintenant être prise en compte, par exemple quant à la distinction entre planorbes immatures et sexuellement mûres.

Selon Hoagland (1984), le terme de protandrie ne devrait être utilisé que pour les espèces chez lesquelles une phase mâle précède une phase femelle ultérieure. Dans le cas de *B. glabrata*, la courte phase mâle précède l'établissement ultérieur et définitif d'un hermaphrodisme simultané. Même s'il est légitime de bien poser les problèmes de sémantique, il était, à mes yeux, plus important de démontrer que, chez *B. glabrata*, la courte phase mâle était fonctionnelle; le terme de protandrie peut, sans véritable ambiguïté, être conservé.

Chez les Pulmonés Stylommatophores, la différenciation des gonocytes femelles est une autodifférenciation, celle des gonocytes mâles nécessitant l'action d'un inducteur androgène. L'autodifférenciation ovarienne, qui par ailleurs a été prouvée chez d'autres groupes de Mollusques et d'autres phyla, n'a pu être démontrée par les expériences de culture *in vitro* chez *B. glabrata*. L'existence d'une autodifférenciation ovarienne ne pourra, à terme, être généralisée aux Basommatophores que par l'étude d'autres modèles, de préférence ceux chez lesquels la différenciation des cellules sexuelles serait plus tardive.

Les expériences de castration ont souligné les différences opposant les Stylommatophores et les Basommatophores. Il est maintenant clairement établi que les premiers présentent un contrôle hormonal, exercé par la gonade, du développement et du fonctionnement des tractus génitaux; les Basommatophores montrent à l'inverse un fonctionnement largement autonome, indépendant de la présence ou de l'absence de la gonade. Dans une perspective purement "économiste", la production de pontes stériles après gonadectomie a certainement un coût important puisqu'elle conduit à une dépense énergétique totalement inutile. Il s'agit là d'une situation purement expérimentale. A cet égard, certains parasites (castrateurs obligatoires) agissent de façon plus fine et peuvent détourner à leur profit une part non négligeable des ressources de l'hôte, sans que les organes sexuels soient directement impliqués. La castration précoce réalisée par *Ribeiroia marini* est à cet égard une véritable réussite.

Chez des hermaphrodites simultanés potentiellement autoféconds et à pores sexuels séparés, la fécondation croisée nécessite qu'un individu s'accouple comme mâle et transfère son autosperme à la partenaire "femelle" qui utilisera ce sperme (allosperme) pour féconder ses ovocytes. Chez *B. glabrata*, le comportement d'un des deux partenaires comme mâle détermine le sens de l'accouplement (Trigwell *et al.*, 1997). Chez *Lymnaea stagnalis*, c'est l'augmentation du volume de la prostate pendant une période d'isolement qui détermine le comportement mâle lors d'un appariement ultérieur (De Boer *et al.*, 1997).

Chez *B. glabrata*, l'existence d'individus albinos et mélaniques a été très largement exploitée, en particulier pour l'étude des phénomènes d'auto- et d'allo-fécondation. Il y a plus de 40 ans, le travail de Paraense (1955) a jeté les bases d'une méthode dont les applications peuvent encore être l'objet de développements futurs. Nos décideurs actuels considèreraient cette publication essentielle comme peu signifiante puisque publiée dans une revue qu'une analyse comptable classe parmi celles dites à faible diffusion. La communauté scientifique, elle, est moins naïve et continue, et continuera sans doute encore longtemps, à s'y référer.

Les études relatives au jeûne (étude finalement purement théorique) et à la dessiccation (visant à étudier au laboratoire les conséquences d'une exondation temporaire fréquemment rencontrée dans la nature) montrent que ces phénomènes modifient assez peu la conservation de l'allosperme reçu lors d'accouplement(s) préalable(s).

L'autofécondation reste un mode de reproduction très efficace chez les individus isolés. Néanmoins, au sein de groupes, c'est l'allofécondation qui domine largement. Cette coexistence de deux modes de fécondation, si facile à confirmer au laboratoire, reste encore peu claire. Ni les explications théoriques ni les observations au laboratoire ne nous donnent une idée précise des phénomènes qui se déroulent réellement dans la nature. L'autofécondation existe-t-elle dans les populations naturelles ou est-elle une simple "précaution" visant à pallier à des situations, bien improbables, d'isolement? La dessiccation, qui peut décimer des populations, n'empêche pas l'utilisation ultérieure de l'allosperme; ce résultat s'oppose à l'explication classique d'une possibilité de recolonisation rapide d'un habitat par recours à l'autofécondation, sans permettre pour autant de proposer d'hypothèse vraiment nouvelle.

Comme toujours, on ne pourra progresser que par l'acquisition d'informations nouvelles, dans au moins deux domaines, physiologique et comportemental, visant à:

- affiner notre connaissance des processus de fécondation (lieu des fécondations, mécanismes de la compétition spermique, rôle de spermatozoïdes apyrènes, ...),
- approfondir notre connaissance des comportements reproducteurs.

Il faudra sans doute être très prudent quant à la généralisation des résultats. Par exemple, on sait que chez *B. truncatus*, un accouplement n'implique pas nécessairement une insémination des individus "femelles" qui pratiquent malgré tout majoritairement l'autofécondation. Chez *B. glabrata*, l'albinisme, en permettant d'étudier aisément et à moindres frais, la totalité d'une descendance, sera encore largement utilisé, au moins pour l'analyse de situations simples où la réalité d'un transfert de sperme peut être établie avec certitude.

La biologie moléculaire peut prendre le relai et seule permettre de résoudre des problèmes actuellement sans solution. Les progrès les plus significatifs ont été accomplis chez les bulins et les ancyles; je n'alourdirai pas la bibliographie qui accompagne le présent article en donnant les nombreuses références correspondantes mais on peut aisément en retrouver l'essentiel dans deux thèses récentes: Doums (1995) et Viard (1996). Des résultats ont déjà été obtenus à l'aide de la biolgie moléculaire chez *B. glabrata* par:

- électrophorèse des protéines (cf. références *in* Vernon *et al.*, 1995),
- RFLPs (Knight *et al.*, 1991)
- RAPDs (Simpson *et al.*, 1994; Vidigal *et al.*, 1994).

Actuellement, le problème, fondamental chez *B. glabrata*, de la distinction dans une descendance d'individus issus de l'un ou l'autre mode de fécondation, reste encore aujourd'hui posé. Vernon *et al.*, (1995) apportent des indications importantes quant à la faisabilité technique de la RAPD-PCR et au matériel utilisé, c'est à dire des planorbes que peu de générations séparent des spécimens sauvages dont ils sont issus. Les résultats, qu'on doit considérer comme préliminaires, confirment que les animaux appariés pratiquent plus volontiers la fécondation croisée que l'autofécondation. L'application future de la technique à des situations expérimentales plus complexes ou à l'analyse chronologique d'une descendance, confirmera sans doute l'intérêt de la méthode.

Des articles classiques concernent l'appareil génital et son fonctionnement (Duncan, 1960a, 1960b, 1975; Fretter et Graham, 1964; Joosse et Geraerts, 1983; Geraerts et Joosse, 1984). Une série de réflexions particulièrement pertinentes ont été publiées par Visser (1977, 1981, 1988) et concernent l'évolution de l'appareil génital; elles concluent, entre autres, qu'il faut considérer les Basommatophores comme néoténiques. Enoncée aussi abruptement, l'affirmation peut surprendre, mais les arguments avancés méritent d'être pris en considération et, à l'avenir, intégrés à toute réflexion générale sur la reproduction des Gastéropodes.

J'ai dit dans l'introduction que les deux Basommatophores dont la biologie, et particulièrement la reproduction, est la mieux connue, sont *L. stagnalis* et *B. glabrata*. Chez les deux espèces, le fonctionnement de l'appareil génital est connu dans ses grandes lignes. Les domaines de recherche respectifs sont pourtant loin d'être superposables. Chez *L. stagnalis*, les détails des mécanismes neuro-endocriniens ont été étudiés de façon particulièrement approfondie. Chez *B. glabrata*, on dispose par contre d'informations nombreuses relatives aux modes de fécondation et aux échanges génétiques entre individus. Cela peut être dû en partie aux sensibilités respectives des chercheurs impliqués mais c'est certainement largement lié à la nature du matériel biologique. A titre d'exemple, les interventions chirurgicales au niveau du SNC sont réalisables chez *L. stagnalis* et quasi impossibles chez *B. glabrata*. A l'inverse, une intervention chirurgicale comme la castration a été possible chez *B. glabrata* et chez d'autres Planorbidae; elle fait toujours défaut chez *L. stagnalis* (je n'ai personnellement jamais obtenu de survie supérieure à 13 jours, délai trop court pour observer des changements significatifs quant aux mécanismes reproducteurs).

Par la facilité de sa maintenance au laboratoire, par l'existence de deux modes de fécondation sur lesquels l'expérimentateur peut jouer aisément, par l'existence d'un marqueur génétique tel que l'albinisme, *B. glabrata* reste un modèle animal sans doute assez exceptionnel sinon unique et on comprend aisément l'ampleur des travaux qui lui ont été consacrés.

J'ai essayé de montrer l'évolution de nos connaissances, ses lignes directrices mais aussi quelques fausses pistes qui traînent encore dans la littérature. Je me suis efforcé de faire référence aux articles de base qui, les premiers, ont apporté des informations originales. Selon les sujets abordés, la bibliographie a porté sur des espèces voisines (autres planorbes, limnées) ou plus largement sur les Basommatophores ou même les Mollusques, mais elle a été, pour des raisons purement pratiques, souvent limitée à *B. glabrata*. J'ai parfois passé sous silence observations et expériences réalisées chez d'autres Basommatophores (*Helisoma*, divers bulins, physidés, ancylidés), lorsque des protocoles voisins n'avaient pas été mis en oeuvre chez *B. glabrata*.

L'hermaphrodisme constitue bien sûr la trame essentielle qui sous-tend cet article. Même en se limitant aux seuls Mollusques, divers aspects de l'hermaphrodisme ont été, depuis un siècle, l'objet de synthèses mais aussi de réflexions plus générales: Pelseneer, 1896; Coe, 1944; Bacci, 1951; Joosse, 1972, Gomot, 1977; Heller, 1993; Jarne *et al*., 1993). La mise en perspective avec ces bilans successifs, permet de mieux intégrer les résultats et interrogations rapportés ici, dans une vision plus globale de l'hermaphrodisme et de ses modalités. On peut aussi y trouver une justification, s'il en était besoin, à poursuivre l'étude de la reproduction chez l'hermaphrodite simultané *B. glabrata*.

## BIBLIOGRAPHIE


Abdel-Malek E., 1954a. Morphological studies on the family Planorbidae (Mollusca: Pulmonata). I. Genital organs of *Helisoma trivolvis* (Say) (subfamily Helisomatinae F.C. Baker, 1945). *Transactions of the American Microscopical Society* **73**: 103-124.

Abdel-Malek E., 1954b. Morphological studies on the family Planorbidae (Mollusca: Pulmonata). II. The genital organs of *Biomphalaria boissyi* (subfamily Planorbinae, H.A. Pilsbry, 1934). *Transactions of the American Microscopical Society* **73**: 285-296.

Ahmed M., Upatham E., Brockelman W. & Viyanant V., 1986. Population responses of the snail *Bulinus (Physopsis) abyssinicus* to differing initial social and crowding conditions. *Malacological Review* **19**: 83-89

Alaphilippe F., 1959. Contribution à l'étude anatomique et histologique des voies génitales de *Planorbis (Planorbarius) corneus* L. (Gastéropode Pulmoné) *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* **93**: 260-287.

Alaphilippe F. & Regondaud J., 1959. Contribution à l'étude du carrefour des voies génitales chez *Planorbis (Planorbarius) corneus* L. et *Limnaea stagnalis* L. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **84**: 485-493.

Albanese M. & Bolognari A., 1961. Aspetti strutturali e citochimici dell'apparato nucleolare degli ovociti in accrescimento di *Planorbis corneus* L. (Moll. Gast. Polm.). *Caryologia* **14** : 329-347.

Albanese M. & Bolognari A., 1964. Mitochondri, zone del Golgi e globuli vitellini negli ovociti in accrescimento di *Planorbis corneus* L. (Moll. Gast. Polm.). *Experientia* **20**: 29-30.

Allen C., 1935. Self-fertilization. *Journal of Conchology* **20**: 126.

Ancel P., 1903. Histogenèse et structure de la glande hermaphrodite d'*Helix pomatia* (Linn.). *Archives de Biologie* **19**: 389-652.

Anelli C., Franchi E. & Camatini M., 1985. Structure and possible functional role of septate junctions in the ovotestis of a pond snail: inter-Sertoli junctions. *Journal of Submicroscopic Cytology* **17**: 213-222.

Appleton C., 1978. Review of literature on abiotic factors influencing the distribution and life cycles of bilharziasis intermediate host snails. *Malacological Review* **11**. 1-25.

Aubry R., 1954. Les éléments nourriciers dans la glande hermaphrodite de *Limnaea stagnalis* adulte. *Compte rendu des séances de la Société de Biologie* **148**: 1626-1629.

Aubry R., 1955. De la possibilité d'une autofécondation dans l'acinus hermaphrodite de *Limnaea stagnalis* adulte. *Compte rendu des séances de la Société de Biologie* **149**: 390-392.

Aubry R., 1956. La structure du canal hermaphrodite chez *Limnaea stagnalis* adulte. *Compte rendu des séances de la Société de Biologie* **150**: 1786-1789.

Azevedo J. F. de, Costa Faro M. & Pequito M., 1958. Sur l'autofécondation de l'*Australorbis glabratus olivaceus*. *Garcia de Orta* **6**: 591-598.

Bacci G., 1951. Ermaphroditismo ed intersessualità nei Gasteropodi e Lamellibranchi. *Attualità Zoologiche*, suppl. dell' *Archivio Zoologico Italiano* **7**: 57-151.

Bailey J., Michelson E. & Paraense W.L.,1986. Differentiation of the sibling species *Biomphalaria occidentalis* and *Biomphalaria tenagophila* by the electrophoretic patterns of their hemoglobin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **81**: 319-322

Baker H., 1960. *Planorbina* (1843) vs. *Australorbis* (1934) vs. *Biomphalaria* (1910) vs *Taphius* (1854) *The Nautilus* **74**: 35-37.

Bandoni S., Mulvey M. & Loker E., 1995. Phylogenetic analysis of eleven species of *Biomphalaria* Preston, 1910 (Gastropoda: Planorbidae) based on comparisons of allozymes. *Biological Journal of the Linnean Society* **54**: 1-27.

Barbosa F., Hubendick B., Abdel Malek E. & Wright C., 1961. The generic names *Autralorbis, Biomphalaria, Platytaphius, Taphius* and *Tropicorbis* (Mollusca, Planorbidae). *Annals and Magazine of Natural History* **4**: 371-375.

Barbosa F., Pereira Da Costa D. & Arruda F., 1985. Competitive interactions between species of fresh-water snails. I. Laboratory. IC. Comparative survival of *Biomphalaria glabrata* and *B straminea* kept out of water *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **80**: 155-157.

Barbosa N., Pimentel-Souza F. & Sampaio I., 1987. The effect of seasonal temperature and experimental illumination on reproductive rate in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research* **20**: 685-696.

Barth R. & Jansen G., 1959. Contribuições ao Estudo da Gametogênese dos Planorbídeos. 1.ª Parte: Célula Nutridora e sua Função. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **31**: 429-445.

Barth R. & Jansen G., 1960. Ueber den Begriff 'Kinoplasma' in der Spermiogenese von *Australorbis glabratus olivaceus* (Mollusca Pulmonata Planorbidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **58**: 209-228.

Barth R. & Jansen G., 1961. Ueber die formveraenderungen des Golgi-apparates waehrend der spermiogenese von *Australorbis glabratus olivaceus* (Mollusca, Pulmonata, Planorbidae) *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **59**: 83-114.

Barth R. & Jansen G., 1962. Beobachtungen ueber die Entwicklung und Ernaehrung der Eizellen von *Australorbis glabratus olivaceus* (Gastropoda, Pulmonata, Planorbidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **34**: 381-389.

Barth R & Oliveira Filho B., 1964. Submicroscopic structure of the sperm flagellum of *Tratoma infestans* and *Australorbis glabratus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **36**: 559-564.

Baudelot E., 1863. Recherches sur l'appareil générateur des Mollusques Gastéropodes. *Annales des sciences naturelles* **19**: 135-222 et 268-294.

Baur B., 1992. Random mating by size in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*: experiments and an explanation. *Animal Behaviour* **43**: 511-518.

Bayne C., 1973. Physiology of the pulmonate reproductive tract: location of spermatozoa in isolated, self-fertilizing succinid snails (with a discussion of pulmonate terminology). *The Veliger* **16**: 169-175.

Bayne C., Owczarzak A. & Noonan W., 1975. *In vitro* cultivation of cells and a microsporidian parasite of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Basommatophora) *Annals of the New York Academy of Sciences* **266**: 513-527.

Bayomy M. & Joosse J., 1987. The Effects of Isolation, Grouping and Population Density on Fecundity of *Bulinus truncatus*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* **12**: 219-330.

Bayomy M., Elk R. van & Joosse J., 1987. The effects of starvation and refeeding on egg laying and the synthetic activity of the albumen gland in *Bulinus truncatus*, a snail vector of urinary schistosomiasis *Comparative Biochemistry and Physiology* **87**: 607-612.

Beeman R., 1970. An Autoradiographic Study of Sperm Exchange and Storage in a Sea Hare, *Phyllaplysia taylori*, a Hermaphroditic Gastropod (*Opisthobranchia Anaspidea*). *Journal of Experimental Zoology* **175**. 125-132.

Benex J., 1961. La survie d'explants de planorbes (*Australorbis glabratus*) en milieu synthétique, antiseptique et nutritif. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences* **253**: 734-736.

Benex J., 1964. Sur la dédifférenciation des tentacules de Planorbes en survie: rôle de la présence d'éléments nerveux sur le retard de cette dédifférenciation. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Academie des Sciences* **258**: 2193-2196.

Benex J., 1966. Les possibilités de la culture organotypique dans l'étude des problèmes parasitaires. La culture organotypique d'explants de Planorbes *Annales de Parasitologie Humaine et comparée* **41**: 351-378.

Beriozkina G. & Starobogatov Y., 1995. Inheritance of pigmentation in some freshwater pulmonate snails. *Ruthenica* **5**: 39-43.

Berrie A., 1970. Snail Problems in African Schistosomiasis. *Advances in Parasitology* **8**: 43-96.

Berry, A. 1977. Gastropoda Pulmonata *In* Reproduction of Marine Invertebrates. (A.C. Giese & J.S. Pearse, eds.) **4**: 181-226.

Boer H. & Joosse J., 1975. Endocrinology. *In* Pulmonates. (V. Fretter & J. Peake, eds.) **1**: 245-307. Academic Press, London New-York & San Francisco.

Boer H., Mohamed A., Van Minnen J. & de Jong-Brink M., 1976. Effects of castration on the activity of the endocrine dorsal bodies of the freshwater pulmonate snail *Bulinus truncatus*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Netherlands Journal of Zoology* **26**: 94-105.

Bogitsh B., 1974a. Acid phosphatase activity in spermatids of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Transactions of the American Microscopical Society* **93**: 365-373.

Bogitsh B., 1974b. Cytochemical observations on the midpiece of the spermatozoa of the gastropod *Biomphalaria glabrata*. *Transactions of the American Microscopical Society* **93**: 211-219.

Bogitsh B., 1975. The cytochemical localization of succinic dehydrogenase in the sperm mitochondria of the gastropod *Biomphalaria glabrata*. A comparison of two methods. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **23**: 75-79

Bondesen P., 1950. A comparative morphological-biological analysis of the egg capsules of freshwater pulmonate Gastropods, Hygrophila, Basommatophora, Pulmonata. *Natura Jutlandica* **3**: 1-208.

Boom-Ort B., 1992. Uptake of sand grains into the stomach of *Biomphalaria glabrata*. *Proceedings of the Tenth International Malacological Congress (Tubingen 1989)* **1**: 109-114.

Bottke W. & Tiedtke A., 1988. An autoradiographic and cytophotometric study of oogenesis in a pulmonate snail, *Planorbarius corneus*. *Cell and Tissue Research* **252**: 67-77.

Bounoure L. & Aubry R., 1956. La structure du canal hermaphrodite de *Limnaea stagnalis* et les possibilités de régénération germinale chez les Gastéropodes pulmonés. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences* **243**: 1453-1455.

Brand T. von & Files V., 1947. Chemical and histological observations on the influence of *Schistosoma mansoni* infection on *Australorbis glabratus*. *The Journal of Parasitology* **33**: 476-482.

Brand T. von, McMahon P. & Nolan M., 1957. Physiological observations on starvation and desiccation of the snail *Australorbis glabratus*. *Biological Bulletin* **113**: 89-102.

Brisson P., 1967. La castration chirurgicale chez *Bulinus* (*contortus* Michaud) *truncatus* (Audouin) (Mollusque Gastéropode Pulmoné). *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences* **264**. 131-133.

Brisson P., 1971. Castration chirurgicale et régénération gonadique chez quelques Planorbidés (Gastéropodes Pulmonés). *Annales d'embryologie et de morphogenèse* **4**: 189-210.

Brisson P., 1982. Etude radioautographique des éléments aminergiques de la région du carrefour génital chez un gastéropode *Malacologia* **22**: 151-157.

Brisson P. & Collin J P., 1977. Systèmes aminergiques des Gastéropodes pulmonés. I - Etude en microscopie de fluorescence et électronique des cellules aminergiques du canal de la glande à albumine chez *Bulinus truncatus*, Audouin. *Biologie cellulaire* **29**: 159-166.

Brisson P. & Regondaud J , 1971. Observations relatives à l'origine dualiste de l'appareil génital chez quelques Gastéropodes Pulmonés Basommatophores. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Academie des Sciences* **273**: 2339-2341.

Brisson P. & Regondaud J., 1977. Origine et structure de l ébauche de la gonade chez les Gastéropodes Pulmonés Basommatophores. *Malacologia* **16**: 457-466.

Brisson P., Regondaud J & Collin J P., 1977. Systemes aminergiques des Gastéropodes pulmonés. II. Mise en évidence au carrefour des voies génitales par la méthode FIF. *Annales de Biologie animale, de Biochimie et de Biophysique* **17**: 1077-1086.

Brown K., 1979 Effects of experimental manipulations on the life history pattern of *Lymnaea stagnalis appressa* (Pulmonata: Lymnaeidae). *Hydrobiologia* **65**: 165-176.

Brumpt E., 1941. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. *Annales de Parasitologie* **18**: 9-45.

Cain G , 1956 Studies on cross-fertilization and self-fertilization in *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Biological Bulletin* **111**: 45-52.

Camey T. & Verdonk N., 1970. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. *Netherlands Journal of Zoology* **20**: 93-121.

Charniaux-Cotton H., 1959. Etude comparée du développement post-embryonnaire de l'appareil génital et de la glande androgène chez *Orchestia gammarella* et *Orchestia mediterranea* (Crustacés Amphipodes). Autodifférenciation ovarienne. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **84**: 105-115.

Charniaux-Cotton H & Ginsburger-Vogel T., 1962. Preuve expérimentale de l'autodifférenciation ovarienne chez *Orchestia montagui* Audouin (Crustacé Amphipode). *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences* **254**: 2836-2838.

Chernin E., 1963. Observations on hearts explanted *in vitro* from the snail *Australorbis glabratus* *The Journal of Parasitology* **49**: 353-364.

Chernin E , 1967. Behavior of *Biomphalaria glabrata* and of other snails in a thermal gradient. *The Journal of Parasitology* **53**: 1233-1240.

Chernin E. & Adler V., 1967. Effects of desiccation on eggs of *Australorbis glabratus* *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **61**: 11-14.

Chernin E. & Michelson E., 1957a. Studies on the biological control of schistosome-bearing snails. III. The effects of population density on growth and fecundity in *Australorbis glabratus*. *American Journal of Hygiene* **65**: 57-70.

Chernin E. & Michelson E , 1957b Studies on the biological control of schistosome-bearing snails. IV. Further observations on the effects of crowding on growth and fecundity in *Australorbis glabratus*. *American Journal of Hygiene* **65**: 71-80.

Coe W., 1944. Sexual differentiation in mollusks. II. Gastropods, amphineurans, scaphopods, and cephalopods. *Quarterly Review of Biology* **19**: 85-97.

Coelho M., 1954. Acção das formas larvarias de *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. *Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhaes* **3**: 39-53.

Cooper L , Ramani S., Martin A., Richards C. & Lewis F., 1992 *Schistosoma mansoni* infections in neonatal *Biomphalaria glabrata* snails. *The Journal of Parasitology* **78**. 441-446.

Cooper L., Richards C., Lewis F & Minchella D., 1994 *Schistosoma mansoni* relationship between low fecundity and reduced susceptibility to parasite infection in the snail *Biomphalaria glabrata* *Experimental Parasitology* **79**: 21-28.

Corrêa J., Dmytraczenko A. & Duarte J., 1967. Structure of a galactan found in the albumen gland of *Biomphalaria glabrata*. *Carbohydrate researches* **3**: 445-452.

Costil K. & Daguzan J., 1988. Influence de la température sur la croissance et le potentiel reproducteur de *Planorbarius corneus* L. (Gastéropode, Pulmoné, Basommatophore, *PLANORBIDAE*) au cours de sa première année de vie, en conditions expérimentales. *Haliotis* **18**: 185-193.

Costil K. & Daguzan J., 1995. Self-fertilization versus Cross-Fertilization in Two Planorbid Species, *Planorbarius corneus* (Linnaeus) and *Planorbis planorbis* (Linnaeus). *The Veliger* **38**: 247-253.

Crews A. & Yoshino T., 1989. *Schistosoma mansoni*. effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* **68**: 326-334.

Crews A. & Yoshino T., 1990. Influence of larval schistosomes on polysaccharide synthesis albumin gland of *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology* **101**: 351-359.

Dannemann R. & Pieri O , 1993. Prolonged survival out of water of polymorphic *Biomphalaria glabrata* (Say) from a seasonally drying habitat of North-East Brazil *Journal of Molluscan Studies* **59**: 263 265.

De Boer P , Jansen R., Koene J. & Ter Maat A., 1997 Nervous control of male sexual drive in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Experimental Biology* **200**: 941-951.

de Jong-Brink M., 1969. Histochemical and electron microscope observations on the reproductive tract of *Biomphalaria glabrata* (*Australorbis glabratus*), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **102**: 507-542.

de Jong-Brink M., 1973. The effects of desiccation and starvation upon the weight, histology and ultrastructure of the reproductive tract of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **136**: 229-262.

de Jong Brink M., Wit A. de, Kraal G. & Boer H., 1976. A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. *Cell and Tissue Research* **171**: 195-219.

de Jong Brink M., Boer H., Hommes T. & Kodde A., 1977. Spermatogenesis and role of Sertoli cells in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Cell and Tissue Research* **181**: 37-58.

de Jong-Brink M., Borg J.P. ter, Bergamin-Sassen M. & Boer H., 1979. Histology and histochemistry of the reproductive tract of the pulmonate snail, *Bulinus truncatus*, with observations on the effects of castration on its growth and histology. *International Journal of Invertebrate Reproduction* **1**: 41-56.

de Jong-Brink M., Schot L., Schoenmakers H. & Bergamin-Sassen M., 1981. A biochemical and quantitative electron microscope study on steroidogenesis in ovotestis and digestive gland of the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. *General and Comparative Endocrinology* **45**: 30-38.

de Jong Brink M., With N. de, Hurkmans P. & Bergamin Sassen M., 1984. A morphological, enzyme-cytological, and physiological study of the blood gonad barrier in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and Tissue Research* **235**: 593-600.

De Visser J., Ter Maat A. & Zonneveld C., 1994. Energy budgets and reproductive allocation in the simultaneous hermaphrodite pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.): a trade-off between male and female function. *The American Naturalist* **144**: 861-865.

DeWitt R., 1954. Reproductive capacity in a pulmonate snail (*Physa gyrina* Say). *The American Naturalist* **88**: 159-164.

DeWitt R., 1967. Stimulation of egg production in a Physid and a Lymnaeid. *Malacologia* **5**: 445-453.

DeWitt R. & Sloan W., 1958. The innate capacity of increase in numbers in the pulmonate snail, *Lymnaea columella*. *Transactions of the American Microscopical Society* **77**: 290-294.

DeWitt R. & Sloan W., 1959. Reproduction in *Physa pomilia* and *Helisoma duryi*. *Animal Behaviour* **1**: 81-84.

Dogterom G., Loenhout H. van, Koomen W., Roubos E. & Geraerts W., 1984. Ovulation hormone, nutritive state, and female reproductive activity in *Lymnaea stagnalis*. *General and Comparative Endocrinology* **55**: 29-35.

Doumenge J.P., Mott K.E., Cheung C., Villenave D., Chapuis O., Perrin M.F. & Reaud-Thomas G., 1987. Atlas de la répartition mondiale des schistosomiases. Talence, CEGET-CNRS; Genève, OMS; Presses Universitaires de Bordeaux, 400 pp.

Doums C., 1995. Evolution des systèmes de reproduction chez les gastéropodes hermaphrodites d'eau douce: le cas de l'aphallie chez *Bulinus truncatus*. *Thèse de Doctorat, Université Montpellier II*, 87pp.

Doums C., Delay B. & Jarne P., 1994. A problem with the estimate of self fertilization depression in the hermaphrodite freshwater snail *Bulinus truncatus*: the effect of grouping. *Evolution* **48**: 498-504.

Duivenboden Y. van, 1983. Transfer of semen accelerates the onset of egg-laying in female copulants of the hermaphrodite freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *International Journal of Invertebrate Reproduction* **6**: 249-257.

Duivenboden Y. van & Ter Maat A., 1985. Masculinity and receptivity in the hermaphrodite pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Animal Behaviour* **33**: 885-891.

Duivenboden Y. van & Ter Maat A., 1988. Mating behaviour of *Lymnaea stagnalis*. *Malacologia* **28**: 53-64.

Duivenboden Y. van, Pieneman A. & Ter Maat A., 1985. Multiple mating suppresses fecundity in the hermaphrodite freshwater snail *Lymnaea stagnalis*: a laboratory study. *Animal Behaviour* **33**: 1184-1191.

Duncan C., 1959. The life cycle and ecology of the freshwater snail *Physa fontinalis* (L.). *Journal of Animal Ecology* **28**: 97-117.

Duncan C., 1960a. The evolution of the pulmonate genital system. *Proceedings of the Zoological Society of London* **134**: 601-609.

Duncan C., 1960b. The genital systems of the freshwater Basommatophora. *Proceedings of the Zoological Society of London* **135**: 339-356.

Duncan C., 1975. Reproduction. *In* Pulmonates. (V. Fretter & J. Peake, eds.) **1**: 309-365. Academic Press, London New-York et San Francisco.

Dupouy J., Nassi H. & Vianey-Liaud M., 1992. Evolution de la castration chez les symbiotes Basommatophores-Digènes. Cas du couple *Biomphalaria glabrata*-Digenea. *Proceedings of the Tenth International Malacological Congress (Tübingen 1989)* **2**: 249-253.

Elk R. van & Joosse J., 1981. The UDP-galactose of *Lymnaea stagnalis* and the effects of photoperiod, starvation and trematode infection on its activity. *Comparative Biochemistry and Physiology* **70B**: 45-52.

Erickson D., Ritchie L. & Caldwell D., 1961. Growth and reproduction of *Australorbis glabratus* fed alginated food. *The Journal of Parasitology* **47**: 50.

Etges F. & Gresso W., 1965. Effect of *Schistosoma mansoni* infection upon fecundity in *Australorbis glabratus*. *The Journal of Parasitology* **51**: 757-760.

Etges F., Carter O & Webbe G., 1975. Behavioral and developmental physiology of schistosome larvae as related to their molluscan hosts. *Annals of the New York Academy of Sciences* **266**: 480-496.

Faust E. & Hoffman W., 1934. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico III. Biological studies. 1. The extra-mammalian phases of the life cycle *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine* **10**: 1-47.

Favard P. & Carasso N., 1958. Origine et ultrastructure des plaquettes vitellines de la planorbe. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale* **47**: 211-229.

Fraser L., 1946. The embryology of the reproductive tract of *Lymnaea stagnalis appressa* Say *Transactions of the American Microscopical Society* **65**: 279-298.

Fretter V & Graham A., 1964 Reproduction *In* Physiology of Mollusca (K Wilbur & M. Yonge, eds.) **1**: 127-164. Academic Press, New-York and London.

Fryer S., Rollinson D. & Probert A., 1987 1987. Studies on the morphology and crossbreeding ability of two populations of *Bulinus globosus* from northern Nigeria. *Journal of Molluscan Studies* **53**. 153-162

Geraerts W. & Joosse J., 1984 Freshwater Snails (Basommatophora). *In* The Mollusca (A Tompa, N. Verdonk & J. Van den Biggelaar, eds.), **7**: 141-207. Academic Press.

Geraerts W & Mohamed A., 1981. Studies on the role of the lateral lobes and the ovotestis of the pulmonate snail *Bulinus truncatus* in the control of body growth and reproduction *International Journal of Invertebrate Reproduction* **3**: 297-308.

Gérard C., 1993. Ecologie d'une interaction durable *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* Dynamique de l'infrapopulation parasite dans l'écosysteme Mollusque, interactions spatiales et énergétiques. *Thèse de Doctorat, Université Paris VI*, 234pp.

Golvan Y., Combes C., Bayssade-Dufour C & Nassi H., 1974. Les cercaires de *Ribeiroia marini* (Faust et Hauffman, 1934), Trématode antagoniste de *Schistosoma mansoni* et provoquant la castration du Mollusque-hôte, vecteur de la bilharziose humaine *Compte rendu hebdomadaire des seances de l'Academie des Sciences* **279**: 405-408.

Golvan Y., Combes C. & Nassi H., 1975. Castration du Mollusque *Biomphalaria glabrata* par les larves de divers Trématodes guadeloupéens *Compte rendu hebdomadaire des seances de l'Académie des Sciences* **280**: 1607-1610

Gomot L., 1977. L'hermaphrodisme chez les Mollusques Gastéropodes *In* Problèmes actuels d Endocrinologie et de Nutrition. (H.-P. Klotz ed.) : 323-353.

Graber M., Euzeby J & Gevrey J., 1977. Elevage de *Biomphalaria glabrata*, Say, au laboratoire. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* **30**. 293-302

Green P., Dussart G & Gibson C., 1992 Surfacing and water leaving behaviour of the freshwater pulmonate snails *Lymnaea peregra* (Muller), *Biomphalaria glabrata* (Say) and *Bulinus jousseaumei* (Dautzenberg). *Journal of Molluscan Studies* **58**: 169-179.

Griffond B., 1969 Survie et évolution, en culture *in vitro*, des testicules de *Viviparus viviparus* L., Gastéropode Prosobranche à sexes séparés *Compte rendu hebdomadaire des seances de l'Académie des Sciences* **268**. 963-965.

Griffond B., 1975. Analyse expérimentale en culture *"in vitro"* des facteurs de la gamétogénèse chez la Paludine *Viviparus viviparus* L. (Gastéropode prosobranche à sexes séparés) *Annales scientifiques de l'Université de Besançon, Zoologie, physiologie et Biologie animale* **12**: 73-97.

Guyard A., 1969 Autodifférenciation femelle de l'ébauche gonadique de l'Escargot *Helix aspersa* Mull. cultivée sur milieu anhormonal. *Compte rendu hebdomadaire des seances de l'Academie des Science* **268**: 966-969.

Harry H., 1965 Evidence of a gonadal hormone controlling the development of the accessory reproductive organs in *Taphius glabratus* (Say) (Gastropoda Basommatophora) *Transactions of the American Microscopical Society* **84**: 157.

Heller J., 1993. Hermaphroditism in molluscs. *Biological Journal of the Linnean Society* **48**. 19-42

Henriksen U. & Jelnes J., 1980. Experimental taxonomy of *Biomphalaria* (Gastropoda. Planorbidae). I. Methods for experimental taxonomic studies on *Biomphalaria* carried out by horizontal starch gel electrophoresis and staining of twelve enzymes. *Journal of Chromatography* **188**. 169-176.

Herberts C., Frescheville J. de, Quignon M & Golvan Y J., 1989 A comparative study of the protein composition of the albumen gland of two populations of *Biomphalaria glabrata* (Say) differing in their susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Sambon). *Journal of Molluscan Studies* **55**: 373-377.

Hoagland K., 1984. Use of the terms protandry, protogyny and hermaphroditism in malacology *American Malacological Bulletin* **3**: 85-88

Holm L., 1946. Hystological and functional studies on the genital tract of *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Transactions of the American Microscopical Society* **65**: 45-68.

Holzfuss E., 1914. Selbstbefruchtung einiger Susswasserschnecken. *Nachrichtsblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* **46**: 67-73.

Hubendick B., 1955 Phylogeny in the Planorbidae *Transactions of the Zoological Society of London* **28**. 453-542.

Hubendick B., 1978 Systematics and comparative morphology of the Basommatophora. *In*. Pulmonates (V. Fretter & J. Peake, eds.) **2A**: 1-47 Academic Press, London New York & San Francisco

Jarne P., Vianey-Liaud M. & Delay B., 1993. Selfing and outcrossing in hermaphrodite freshwater gastropods (Basommatophora). where, when and why. *Biological Journal of the Linnean Society* **49**: 99-125.

Jelnes J., 1982a. Enzyme profile of *Biomphalaria* and *Bulinus* species (Mollusca, Pulmonata). *Malacologia* **22**: 45-47

Jelnes J., 1982b Experimental taxonomy of *Biomphalaria* (Gastropoda, Pulmonata). II Electrophoretic observations of eight enzyme systems of the South American species: *Biomphalaria glabrata, B. straminea and B. tenagophila*. *Journal of Natural History* **16**: 209-217.

Jelnes J. & Pointier J.-P., 1985 Taxonomie expérimentale de *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) - III. Mobilités enzymatiques considérées comme éléments de diagnostic pour les *Biomphalaria* antillais. Etude de sept systèmes enzymatiques. *Malacologia* **26**: 137-143.

Joosse J., 1972. Endocrinology of reproduction in Molluscs *General and Comparative Endocrinology*, suppl 3: 591-601.

Joosse J., 1984 Photoperiodicity, rhythmicity and endocrinology of reproduction in the snail *Lymnaea stagnalis*. *In:* Photoperiodic regulation of insect and molluscan hormones. *Ciba Foundation symposium* **104**: 204-220.

Joosse J. & Geraerts W., 1983 Endocrinology. *In* The Mollusca (A. Saleuddin & K. Wilbur, eds.) **4**: 317-406 Academic Press

Joosse J. & Reitz D., 1969 Functional anatomical aspects of the ovotestis of *Lymnaea stagnalis* *Malacologia* **9**. 101-109

Joosse J., Boer M. & Cornelisse C., 1968 Gametogenesis and oviposition in *Lymnaea stagnalis* as influenced by gamma-irradiation and hunger. *Symposium of the Zoological Society of London* **22**: 213-235.

Jung Y., 1992. Phylogenetic relationships of some planorbid genera (Gastropoda: Lymnophila) *Malacological Review* **25**: 73-102.

Kawano T., Okazaki K. & Ré L., 1992 Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. *Malacologia* **34**: 25-32.

Kawazoe U. 1977. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) (Pulmonata, planorbidae). II - Fecundidade e fertilidade. *Revista de Saude publica, São Paulo* **11**: 47-64.

Khan H. & Saleuddin A., 1983 Cell contacts between follicle cells and the oocyte of *Helisoma* (Mollusca, Pulmonata). *Journal of Morphology* **177**: 319-328.

Kitajima E. & Paraense W.L., 1976. The ultrastructure of mature sperms of the fresh-water snail *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda). *Transactions of the American Microscopical Society* **95**: 1-10.

Kitajima E. & Paraense W.L., 1983. The ultrastructure of the spermatheca of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Pulmonata). *Journal of Morphology* **176**: 211-220.

Knight M., Brindley P., Richards C. & Lewis F., 1991. *Schistosoma mansoni*: use of a cloned ribosomal RNA gene probe to detect restriction fragment length polymorphisms in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* **73**: 285-294.

Lagrange E., 1957 Fécondité et régime chez *Planorbis glabratus*. *Bulletin de la Société de Pathologie exotique* **50**: 804-811.

Larambergue M. de, 1937 Variétés pigmentaires de *Bulinus (Isidora) contortus* Mich ; leur interêt dans l'analyse génétique des processus de fécondation. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences* **205**: 1097-1099

Larambergue M. de, 1939 Etude de l'autofécondation chez les Gastéropodes Pulmonés. Recherches sur l'aphallie et la fécondation chez *Bulinus (Isidora) contortus* Michaud. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* **73**: 19-231.

Lefcort H. & Bayne C., 1991. Thermal preferences of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) exposed to *Schistosome mansoni* (Trematoda). *Parasitology* **103**: 357-362.

Leonard J. & Lukowiak K., 1987. Sperm sharing in *Biomphalaria* snails. *Nature* **325**: 737.

Lévêque C., Pointier J. P. & Toffart J.-L., 1978 Influence de quelques facteurs du milieu sur la fécondité de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Pulmonata) dans les conditions du laboratoire. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **53**. 393-402.

Leverj., Vries C. de & Jager J., 1965. On the anatomy of the central nervous system and the location of neurosecretory cells in *Australorbis glabratus*. *Malacologia* **2**: 219-230

Locard A., 1883 Sur quelques cas d'albinisme et de mélanisme chez les Mollusques terrestres et d'eau douce de la faune française. *Annales de la Société d'Agriculture, Histoire Naturelle et Arts utiles de Lyon*, 36pp.

Loker E., 1979. Effects of *Schistosomatium douthitti* infection on the growth, survival and reproduction of *Lymnaea catascopium*. *Journal of Invertebrate Pathology* **34**: 138-144.

Looker D. & Etges F., 1979. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on fecundity and perivitelline fluid composition in *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology* **65**: 880-885.

Lubet P. & Streiff W., 1969. Etude expérimentale de l'action des ganglions nerveux sur la morphogenèse du pénis et l'activité génitale de *Crepidula fornicata* Phil. (Mollusque Gastéropode). *In* Culture d'organes d'Invertébrés (H. Lutz ed.) **2**: 141-149. Gordon & Breach, Paris, Londres et New-York

McMahon P., Brand T. von & Nolan M., 1957 Observations on the polysaccharides of the aquatic snails *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **50**: 219-239.

Madsen H., Thiongo F. & Ouma J., 1983 Egg laying and growth in *Helisoma duryi* (Wetherby) (Pulmonata, Planorbidae): effect of population density and mode of fertilization *Hydrobiologia* **106**: 185-191.

Marcuzzi G , 1950 Notas sobre la anatomia y la histologia del caracol *Australorbis glabratus* (Moll., Gasteropoda). *Archivos Venezolanos de Patologia Tropical y Parasitologia médica* **2:** 1-74.

Mascara D. & Morgante J , 1991 Enzyme polymorphism and genetic structure of *Biomphalaria tenagophila* (Gastropoda, Planorbidae) populations: founder effect. *Revista Brasileira de Genetica* **14:** 631-644.

Mascara D. & Morgante J., 1995. Use of isozyme patterns in the identification of *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) and *B occidentalis* (Paraense, 1981) (Gastropoda, Planorbidae) *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **90:** 359-366.

Mat I. & Thomas J., 1993. The influence of food deprivation and recommencement of feeding on certain aspects of nitrogen metabolism in *Biomphalaria glabrata* (SAY). *Sains Malaysiana* **22:** 39-53.

Meier M & Meier-Brook C., 1981. *Schistosoma mansoni* effect on growth, fertility, and development of distal male organs in *Biomphalaria glabrata* exposed to miracidia at different ages. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* **66** 121-131.

Meier-Brook C., 1984. A preliminary biogeography of freshwater pulmonate gastropods. *In* World-wide snails. (A. Solem & A. van Bruggen, eds ). 23-37. E J. Brill/W. Backhuys, Leiden

Mello D., 1972 The comparative morphology of the genital system of some African species of *Biomphalaria* (Mollusca, Planorbidae). *Revista Brasileira de Biologia* **32:** 442-450.

Mello M & Paraense W.L., 1978. Geographical differences in lectinic activity of albumen gland extracts of the planorbid snails *Biomphalaria glabrata* and *B tenagophila* *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo* **20:** 115-120.

Merton H., 1930 Die Wanderungen der Geschlechtszellen in der Zwitterdruese von *Planorbis* *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **10:** 527-551.

Michelson E., 1961. The effects of temperature on growth and reproduction of *Australorbis glabratus* in the laboratory. *American Journal of Hygiene* **73:** 66-74.

Michelson E & Dubois L., 1975. Intraspecific variations in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Malacologia* **15:** 105-111.

Michelson E. & Dubois L., 1977 Agglutinins and lysins in the molluscan family Planorbidae: a survey of haemolymph, egg-masses and albumen glands extracts. *Biological Bulletin* **153:** 219-227

Miksys S & Saleuddin A., 1987. Effects of castration on growth and reproduction of *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* **12:** 145-160

Minchella D. & Loverde P., 1981. A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata* *The American Naturalist* **118:** 876-881.

Monteiro W., 1987. Sperm sharing in *Biomphalaria* snails. Reply. *Nature* **325:** 738.

Monteiro W., Almeida J. & Dias B , 1984 Sperm sharing in *Biomphalaria* snails: a new behavioural strategy in simultaneous hermaphroditism. *Nature* **308:** 727-729.

Mulvey M. & Vrijenhoek R , 1984 Genetics of *Biomphalaria glabrata*: linkage analysis and crossing compatibilities among laboratory strains. *Malacologia* **25:** 513-524.

Nassi H , 1978. Données sur le cycle biologique de *Ribeiroia marini guadeloupensis* n ssp. Trematode sterilisant *Biomphalaria glabrata* en Guadeloupe. Entretien du cycle en vue d'un contrôle éventuel des populations de Mollusques. *Acta Tropica* **35:** 41-56.

Nassi H , 1979. Coincidence entre le blocage précoce de la ponte de *Biomphalaria glabrata* (Gasteropoda. Pulmonata) et la localisation cérébrale des jeunes rédies mères de *Ribeiroia marini guadeloupensis* (Trematoda: Cathaemasiidae). *Compte rendu hebdomadaire des seances de l'Académie des Sciences* **289:** 165-168

Nassi H., 1982. Données sur un mécanisme indirect de blocage de la ponte de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Pulmonata) par les larves d'un Trématode. *Malacologia* **22:** 5-8.

Nassi H., 1990 Le complexe *Biomphalaria glabrata*-Digènes en Guadeloupe Contribution à l'étude de la castration des Mollusques par les Digènes larvaires *These de Doctorat es Sciences, Université de Perpignan*, 136 pp.

Nassi H & Dupouy J., 1988. Réponses sexuelles du Basommatopre *Biomphalaria glabrata* au parasitisme larvaire (rédies, sporocystes) de différents Trématodes (Cathaemasiidae, Echinostomatidae, Clinostomidae, Strigaeidae). *Haliotis* **18:** 312.

Nassi H , Pointier J -P. & Golvan Y. 1979. Bilan d'un essai de contrôle de *Biomphalaria glabrata* en Guadeloupe à l'aide d'un Trématode stérilisant. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **54:** 185-192.

Nassi H , Vianey-Liaud M. & Dupouy J., 1986 Hemocytophagy and germinophagy of the rediae of *Ribeiroia marini* (Trématode, Cathemasiidae) during the prepatent period of development in sexually mature *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata, Planorbidae). *Proceedings of the Eighth International Malacological Congress (Budapest 1983)* : 179-182.

Newton W , 1954. Albinism in *Australorbis glabratus* *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **21:** 72-74.

Newton W , 1955. The establishment of a strain of *Australorbis glabratus* which combines albinism and high susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* *The Journal of Parasitology* **41:** 526-528.

Njiokou F., Bellec C., N'Goran E , Yapi Yapi G , Delay B & Jarne P., 1992. Comparative fitness and reproductive isolation between two *Bulinus globosus* (Gastropoda: Planorbidae) populations. *Journal of Molluscan Studies* **58:** 367-376.

Noland L. & Carriker M., 1946 Observations on the biology of the snail *Lymnaea stagnalis* during twenty generations in laboratory culture. *American Midland Naturalist* **36**: 467-493.

Oldham C., 1928 Albinistic varieties of *Planorbis corneus* (L.). *Proceedings of the Malacological Society of London* **18**: 42-44.

Oliver L., 1956 Observations on vectors of schistosomiasis mansoni kept out of the water in the laboratory I. *The Journal of Parasitology* **42**: 137-146.

Oliver L. & Barbosa F., 1956. Observations on vectors of schistosomiasis mansoni kept out of the water in the laboratory. II. *The Journal of Parasitology* **42**: 277-286.

Pan C.T., 1958 The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus* *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College* **119**: 238-299.

Pan C.T., 1965 Studies on the host parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **14**: 931-976.

Paraense W.L., 1955. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **53**: 285-291.

Paraense W.L., 1956. A genetic approach to the systematics of planorbid molluscs. *Evolution* **10**: 403-407.

Paraense W.L., 1958. The genera *Australorbis*, *Tropicorbis*, *Biomphalaria*, *Platytaphius* and *Taphius*. *Revista Brasileira de Biologia* **18**: 65-80.

Paraense W.L., 1959. One-sided reproductive isolation between geographically remote populations of a planorbid snail. *The American Naturalist* **93**: 93-101.

Paraense W.L., 1961a Shell versus anatomy in planorbid systematics. I. *Australorbis glabratus*. *Revista Brasileira de Biologia* **21**: 163-170.

Paraense W.L., 1961b. The nomenclature of Brazilian planorbids. I. *Australorbis glabratus* (Say, 1818). *Revista Brasileira de Biologia* **21**: 287-296.

Paraense W.L., 1975. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros (Mollusca, Gastropoda) *Arquivo do Museu nacional, Rio de Janeiro* **55**: 105-128.

Paraense W.L., 1976. The sites of cross- and self-fertilization in planorbid snails. *Revista Brasileira de Biologia* **36**. 535-539.

Paraense W.L., 1987. Sperm sharing in *Biomphalaria* snails. *Nature* **325**: 737.

Paraense W.L., 1993. Egg-laying induced by insemination in *Biomphalaria* snails. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **88**: 551-555.

Paraense W.L. & Corrêa L., 1958. Self-fertilization in the freshwater snails *Helisoma duryi* and *Helisoma trivolvis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **83**: 405-409.

Paraense W.L. & Deslandes N., 1955a. Isolamento reprodutivo entre *Australorbis glabratus* e *A. nigricans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **53**: 321-324.

Paraense W.L. & Deslandes N., 1955b Observations on the morphology of *Australorbis glabratus* *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **53**: 87-103.

Paraense W.L. & Deslandes N., 1959. The renal ridge as a reliable character for separating *Taphius glabratus* from *Taphius tenagophilus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **8**: 456-472.

Paraense W.L., Pointier J.-P., Delay B., Pernot A., Incani R., Balzan C. & Chrosciechowski P., 1992. *Biomphalaria prona* (Gastropoda: Planorbidae): a morphological and biochemical study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **87**: 171-179.

Pelseneer P., 1896. L'hermaphroditisme chez les Mollusques. *Archives de Biologie* **14**: 33-62.

Perlowagora-Szumlewicz A., 1958. Studies on the biology of *Australorbis glabratus*, schistosome-bearing brazilian snail. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* **10**: 459-529.

Pieri O. & Thomas J., 1986 Polymorphism in a laboratory population of *Biomphalaria glabrata* from a seasonally drying habitat in north-east Brazil. *Malacologia* **27**: 313-321.

Pieri O., Raymundo J. & Jurberg P., 1980. Estudos sobre o comportamento dos planorbídeos. II Enterramento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) como meio de proteção contra a dessecação. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **75**: 83-88.

Pimentel Souza F., Schall V., Barbosa N., Schettino M. & Lautner N., 1988. Influence of experimental illumination and seasonal variation on crossbreeding mating in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **83**: 79-85.

Pimentel Souza F., Barbosa N. & Resende D., 1990. Effect of temperature on the reproduction of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **23**: 441-449.

Plesch B., de Jong Brink M. & Boer H., 1971. Histological and histochemical observations on the reproductive tract of the hermaphrodite pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology* **21**. 180-201.

Pointier J.-P., Salvat B., Deleplanque A. & Golvan Y., 1977. Principaux facteurs régissant la densité des populations de *Biomphalaria glabrata* (Say 1818), Mollusque vecteur de la Schistosomose en Guadeloupe (Antilles françaises). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* **52**: 277-323

Raven C., 1963 The nature and origin of the cortical and morphogenetic field in *Limnaea*. *Developmental Biology* **7**: 130-143.

Richards C., 1967a. Estivation of *Biomphalaria glabrata* (Basommatophora Planorbidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **16**: 797-802.

Richards C., 1967b. Genetic studies on *Biomphalaria glabrata* (Basommatophora: Planorbidae), a third pigmentation allele. *Malacologia* **5**: 335-340.

Richards C , 1969. Genetic studies on *Biomphalaria glabrata* mantle pigmentation. *Malacologia* **9**: 339-348.

Richards C., 1973. Pigmentation variations in *Biomphalaria glabrata* and other planorbidae. *Malacological Review* **6**: 49-51.

Richards C. & Ferguson F., 1965. Variability in *Australorbis glabratus* (Say). *Transactions of the American Microscopical Society* **84**: 580-587.

Richards C. & Minchella D , 1986. Genetic studies of biphallic *Biomphalaria glabrata*. *Malacologia* **27**. 243-247

Ritchie L., Berrios-Duran L. & Deweese R., 1963 Biological potentials of *Australorbis glabratus*: growth and maturation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **12**: 264-268.

Ritchie L., Hernandez A. & Rosa-Amador R., 1966. Biological potentials of *Australorbis glabratus*: life span and reproduction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **15**. 614-617.

Rodrigues Pires E., Vidigal T., Teles H., Simpson A. & Carvalho O., 1997. Specific identification of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria occidentalis* populations by the low stringency polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **92**: 101-106.

Rogers S & Reeder R., 1987. Structure and function of the Spermatheca in a Snail Host of Schistosomiasis, *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Morphology* **191**: 295-308.

Rollinson D., Kane R. & Lines J., 1989 An analysis of fertilization in *Bulinus cernicus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Zoology* **217**: 295-310.

Rollo C. & Hawryluk M., 1988 Compensatory scope and resource allocation in two species of aquatic snails. *Ecology* **69**: 146-156.

Rozemberg B., Rey L. & Pieri O , 1992. Fecundity of *Biomphalaria straminea* and *B. glabrata* in the laboratory: a twelve-month comparative study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **87, suppl. I**: 223-232.

Rudolph P., 1980 Sequence of secretory product formation in maturing reproductive systems of the fresh-water lymnaeid snail *Stagnicola elodes* (Say). *Transactions of the American Microscopical Society* **99**. 193-200

Rudolph P., 1983. Copulatory activity and sperm production in *Bulinus* (*Physopsis*) *globosus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies* **49**: 125-132.

Rudolph P. & Bailey J., 1985. Copulation as females and use of allosperm in the freshwater snail genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies* **51**: 267-275.

Rupp J., 1996. Parasite-altered behaviour: impact of infection and starvation on mating in *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology* **113**: 357-365.

Russel-Hunter W & Mc Mahon R., 1976 Evidence for functional protandry in a freshwater basommatophoran limpet, *Laevapex fuscus*. *Transactions of the American Microscopical Society* **95**: 174-182.

Saleuddin A , Kunigelis S., Schollen L , Breckenridge W & Miksys S , 1982 Studies on endocrine control of reproduction in *Helisoma* and *Helix*. *In* Molluscan Neuroendocrinology (J. Lever & H Boer, eds ) : 138-142. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

Schalie H. van der & Berry E., 1973. The effects of temperature on growth and reproduction in aquatic snails *Malacological Review* **6**: 60.

Schall V., Jurberg P. & Vasconcellos M , 1985 Orientation to light of juvenile and adult forms of melanic and albino populations of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **80**: 101-111.

Scheerboom J., 1978. The influence of food quantity and food quality on assimilation, body growth and egg production in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.) with particular reference to the haemolymph glucose concentration. *Proceedings. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen* **81**: 184-197

Scheerboom J & Geldof A., 1978. A quantitative study of the assimilation of different diets in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.), introducing a method to prevent coprophagy *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen* **81**: 173-183.

Scherrer J., Chquiloff M & Freitas J., 1976. Estudo comparativo da reprodução em quatro variedades genéticas de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). I - Fecundidade. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo* **18**: 315-321.

Schmolder U & Becker W , 1990. Uptake of mineral particles by *Biomphalaria glabrata* (Say) (Pulmonata, Mollusca) and its importance for growth rate and egg production *International Revue Gesamten Hydrobiologie* **75**: 95-101.

Siefker C., Cather J. & Blankespoor H , 1977. Tolerance of *Biomphalaria glabrata* embryos to continous thermal stress. *Malacological Review* **10**: 31-36.

Simpson A., Dias Neto E , Vidigal T., Pena H , Carvalho O. & Pena S , 1995. DNA Polymorphism of schistosomes and their snail hosts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**: 211-213.

Standen O., 1951. Some observations upon the maintenance of *Australorbis glabratus* in the laboratory. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **45**: 80-83.

Starke F., 1971. Elektronenmikroskopische untersuchung der Zwittergonadenacini von *Planorbarius corneus* L (Basommatophora). *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **119**. 483-514

Staub R. & Ribi G., 1995. Size-assortative mating in a natural population of *Viviparus ater* (Gastropoda. Prosobranchia) in lake Zürich, Switzerland. *Journal of Molluscan Studies* **61**: 237-247.

Streiff W., 1964. Survie d'organes de Mollusques marins en culture in vitro. Résultats obtenus sur les milieux $A_6$, $A_7$, $A_{7C}$ et $A_{8C}$. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **89**: 56-59.

Streiff W., 1966. Autodifferenciation ovarienne chez un Mollusque Prosobranche hermaphrodite protandre *Calyptraea sinensis* (L.) ' *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences* **263**: 539-542.

Streiff W., 1967. Etude endocrinologique du déterminisme du cycle sexuel chez un Mollusque hermaphrodite protandre *Calyptraea sinensis* (L.) III - Mise en évidence par culture *in vitro* de facteurs hormonaux conditionnant l'évolution de la gonade. *Annales d'Endocrinologie* **28**: 641-656

Streiff W. & Peyre A., 1963. Survie, en culture *in vitro*, d'organes de *Calyptraea sinensis* L. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences* **256**: 292-294.

Sturrock R., 1970 An investigation of some factors influencing the survival of St Lucian *Biomphalaria glabrata* deprived of water. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **64**. 365-371.

Sturrock B & Sturrock R , 1970a. Laboratory studies of the host-parasite relationship of *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata* from St Lucia, West Indies. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **64**: 357-363

Sturrock R & Sturrock B., 1970b. Observations on some factors affecting the growth rate and fecundity of *Biomphalaria glabrata* (Say). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **64**: 349-355.

Sturrock R. & Sturrock B., 1972. The influence of temperature on the biology of *Biomphalaria glabrata* (Say),intermediate host of *Schistosoma mansoni* on St Lucia, West Indies. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **66**: 385-390.

Tardy J., 1970. Organogenèse de l'appareil génital chez les Mollusques. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **95**: 407-428.

Tenge A., 1980. Strukturanderungen der Mitteldarmdrüse von *Biomphalaria glabrata* (Say.) unter verschiedenen physiologischen Zustanden sowie deren Beziehungen zur Konzentration einiger Haemolymph-metaboliten. *Dissertation Zoologisches Institut Hamburg*.

Ter Maat A., Lodder J , Veenstra J. & Goldschmeding J., 1982. Suppression of egg-laying during starvation in the snail *Lymnaea stagnalis* by inhibition of the ovulation hormone producing caudo-dorsal cells. *Brain Research* **239**: 535-542.

Thérond A. & Gérard C., 1994. Development of accessory sexual organs in *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) in relation to timing of infection by *Schistosoma mansoni*. consequences for energy utilization patterns by the parasite. *Journal of Molluscan Studies* **60**: 25-31.

Thomas J. & Benjamin M , 1974a. Effects of numbers, biomass and conditioning time on the growth and natality rates of *Biomphalaria glabrata* (Say) the snail host of *Schistosoma mansoni* Sambon. *Journal of Applied Ecology* **11**: 823-840.

Thomas J. & Benjamin M., 1974b. The effects of population density on growth and reproduction of *Biomphalaria glabrata* (Say) (Gasteropoda: Pulmonata). *Journal of Animal Ecology* **43**: 31-50.

Thornhill J., Jones J. & Kusel J., 1986. Increased oviposition and growth in immature *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **93**: 443-450.

Trigwell J. & Dussart G., 1998. Functional protandry in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata), an intermediate host of *Schistosoma*. *Journal of Molluscan Studies* **64**. 285-288.

Trigwell J , Dussart G. & Vianey-Liaud M., 1996 Mating strategies in the freshwater hermaphrodite snail *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) (Gastropoda: Pulmonata). *Haliotis* **26**: 25-32.

Trigwell J., Dussart G. & Vianey-Liaud M., 1997. Pre-copulatory behaviour of the freshwater hermaphrodite snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastropoda. Pulmonata). *Journal of Molluscan Studies* **63**: 116-120.

Van Der Steen W., 1968. Note on the effect of excessive amounts of food on the reproduction of *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Netherlands Journal of Zoology* **18**: 411-414.

Van Der Steen W., 1977. Effects of crowding in freshwater snails. reality or myth ? *Malacologia* **16**: 265-266.

Veldhuijzen J & Cuperus R., 1976. Effects of starvation, low temperature and the dorsal body hormone on the *in vitro* synthesis of galactogen and glycogen in the albumen gland and the mantle of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology* **26**: 119-135.

Vernon J., 1995. Low reproductive output of isolated, self-fertilizing snails· imbreeding depression or absence of social facilitation? *Proceedings of the Royal Society of London* **259**. 131-136.

Vernon J. & Taylor J., 1996. Patterns of sexual roles adopted by the schistosome-vector snail *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies* **62**: 235-241.

Vernon J , Jones C & Noble L., 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal cross-fertilisation in *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Basommatophora). *Journal of Molluscan Studies* **61**: 455-465.

Vianey-Liaud M., 1970. Evolution de l'ovotestis d *Australorbis glabratus* Say (Gastéropode Pulmoné) cultivé seul ou en association avec le système nerveux central. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **95**: 249-258

Vianey-Liaud M., 1972 Etude du contrôle de la maturité des tractus génitaux et de la ponte par castration chirurgicale chez le planorbe *Australorbis glabratus* Say (Pulmoné Basommatophore) *Bulletin de la Société Zoologique de France* **97**: 675-690.

Vianey-Liaud M., 1973a. Données nouvelles sur la culture organotypique de l'ovotestis du planorbe *Australorbis glabratus* (Gastéropode Pulmoné). *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* **114**: 525-535

Vianey-Liaud M 1973b Influence du jeûne sur la production d'oeufs et la ponte chez le planorbe *Australorbis glabratus* (Gastéropode Pulmoné). *Bulletin de la Société Zoologique de France* **98:** 349-361.

Vianey-Liaud M , 1976. Influence de l'isolement et de la taille sur la fécondité du planorbe *Australorbis glabratus* (Gastéropode Pulmoné). *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* **110:** 5-29.

Vianey-Liaud M., 1979a Action de la castration partielle ou totale sur la croissance et le fonctionnement de l'appareil génital chez le Planorbe *Biomphalaria glabrata* (gastéropode pulmoné). *Experientia* **35:** 188-190.

Vianey-Liaud M., 1979b. Influence du jeûne et de la renutrition sur l'oviposition et les gamétogenèses chez le planorbe *Biomphalaria glabrata* (Gastéropode Pulmoné Basommatophore). *Malacologia* **18.** 401-406.

Vianey-Liaud M., 1981. Action des températures élevées sur la reproduction du planorbe *Biomphalaria glabrata* (gastéropode pulmoné). *Experientia* **37:** 696-697.

Vianey-Liaud M , 1982. Effets des hautes températures sur la reproduction de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca Basommatophora). *Malacologia* **22:** 159-165.

Vianey-Liaud M., 1984. Effects of starvation on growth and reproductive apparatus of two immature freshwater snails *Biomphalaria pfeifferi* and *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). *Hydrobiologia* **109:** 165-172.

Vianey-Liaud M., 1989. Growth and fecundity in a black-pigmented and an albino strain of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda. Pulmonata). *Malacological Review* **22:** 25-32.

Vianey-Liaud M., 1990. Biologie de la reproduction de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusque, Gastéropode, Planorbidae). *Thèse de Doctorat es Sciences, Université Montpellier II,* 185 pp.

Vianey-Liaud M., 1992. Sperm storage time in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). fertilization of albino snails by surgically castrated pigmented snails. *Journal of Medical and Applied Malacology* **4:** 99-101.

Vianey-Liaud M , 1995. Bias in the production of heterozygous pigmented embryos from successively mated *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) albino snails. *Malacological Review* **28:** 97-106.

Vianey-Liaud M. & Dussart G., 1994 Starvation, desiccation and use of allosperm in the hermaphrodite freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda. Pulmonata) *Journal of Molluscan Studies* **60.** 255-262.

Vianey-Liaud M. & Lancastre F., 1968. Utilisation d'un milieu diphasique pour la culture organotypique d'explants d'*Australorbis glabratus* (Pulmoné Basommatophore). *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences* **266:** 1317-1319.

Vianey-Liaud M & Lancastre F , 1986a. Laboratory studies on the desiccation of immature stages of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **80.** 257-259.

Vianey-Liaud M. & Lancastre F., 1986b Weight loss and survival of *Biomphalaria glabrata* deprived of water. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **81;** 221-224.

Vianey-Liaud M. et Lancastre F., 1994. Effects of intermittent starvation on mature *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). *Hydrobiologia* **291:** 125-130.

Vianey-Liaud M., Dupouy J., Lancastre F. & Nassi H , 1987 Genetical exchanges between one *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) and a varying number of partners. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **82:** 457-460.

Vianey Liaud M., Nassi H., Lancastre F. & Dupouy J , 1989 Duration of pairing and use of allosperm in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **84:** 41-45.

Vianey-Liaud M., Dupouy J., Lancastre F & Nassi H , 1991. Constant use of allosperm by female-acting snails after successive cross-fertilizations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: planorbidae). *Malacological Review* **24:** 73-78

Vianey-Liaud M., Joly D. & Dussart G , 1996. Sperm competition in the simultaneous hermaphrodite freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata) *Journal of Molluscan Studies* **62.** 451-457.

Viard F., 1996. Autofécondation et migration en populations subdivisées: apport des marqueurs microsatellites chez le gastéropode *Bulinus truncatus. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II,* 87pp.

Vidigal T., Dias Neto E., Carvalho O. & Simpson A , 1994. *Biomphalaria glabrata:* extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Experimental Parasitology* **79:** 187-194.

Vieira E & Senna L , 1970. Estudos sôbre nutrição de *Biomphalaria glabrata* em condiçoes axênicas. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **42:** 179-185.

Visser M., 1977. The morphology and significance of the spermoviduct and prostate in the evolution of the reproductive system of the Pulmonata. *Zoologica Scripta* **6:** 43-54.

Visser M ,1981. Monauly versus diauly as the original condition of the reproductive system of Pulmonata and its bearing on the interpretation of the terminal ducts. *Zeitschrift fur Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* **19:** 59-68.

Visser M., 1988. The significance of terminal duct structures and the role of neoteny in the evolution of the reproductive system of Pulmonata. *Zoologica Scripta* **17:** 239-252.

Warren K. & Newill V., 1967. Schistosomiasis: a bibliography of the world s literature from 1852 to 1962. (Two volumes). The Press of Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA.

Wethington A. & Dillon R., 1993 Reproductive development in the hermaphroditic freshwater snail *Physa* monitored with complementing albino lines. *Proceedings of the Royal Society of London* **252:** 109-114.

Wolff E. & Haffen K., 1952. Sur une technique permettant la culture *in vitro* des gonades embryonnaires des Oiseaux. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences* **234**. 1396-1398

Yusa Y., 1994. Factors regulating sperm transfer in an hermaphroditic sea hare, *Aplysia parvula* Mörch, 1863 (Gastropoda: Opisthobranchia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **181**: 213-221.

Yusa Y., 1996. Utilization and degree of depletion of exogenous sperm in three hermaphroditic sea hares of the genus *Aplysia* (Gastropoda: Opisthobranchia). *Journal of Molluscan Studies* **62**: 113-120.

L. CL. D.
MUSEUM
PARIS

- 5 OCT. 1998

**Normes diverses**

Les noms de taxa devront être cités et utilisés conformément au Code International de Nomenclature Zoologique (édition de 1985). Les noms génériques ou spécifiques seront écrits en *italique*, les noms de familles ou de divisions d'un rang plus élevé, en caractères normaux. Un nom spécifique, générique ou familial apparaissant pour le première fois dans le texte devra être accompagné de son auteur et date de publication. On évitera les tournures de phrases donnant lieu à confusion entre une référence bibliographique et l'auteur et date d'un taxon.

La bibliographie comprendra toutes les références citées dans le texte, et uniquement celles-ci. Toutefois, les références citées uniquement en tant qu'auteur et date d'un taxon ne sont pas obligatoirement incluses dans la bibliographie. Les titres des périodiques doivent apparaître *in extenso*. Les références seront citées selon un des modèles suivants:

Bourguignat J.R., 1857. Aménités malacologiques. *Revue et magasin de zoologie*, (2)9: 3-31, pl. 1-4.

Swofford D.L. & Olsen G.J., 1990. Phylogeny reconstruction. *In:* Molecular systematics. (D.M. Hillis & C. Morris, eds.): 411-501. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets.

Dans le texte, on citera les références sous la forme "... selon Hall (1986)... ", " (Hall and Smith, 1986)", (Richardson *et al.*, 1985)...". Pour plusieurs articles d'un même auteur et d'une même date, on utilisera la forme "1985a, 1985b..."

Les tirés-à-part devront être commandés au moment des épreuves. Pour chaque article, 25 tirés-à-part gratuits seront envoyés aux auteurs. Des tirés-à-part supplémentaires, payants, pourront être commandés au même moment.

**Comité de rédaction**

| | |
|---|---|
| Patrick ARNAUD | Station Marine d'Endoume, Rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille |
| Alan BEBBINGTON | 3 Crawley Lane, Uley, Nr Dursley, Glos GL11 5 BJ, GrandeBretagne |
| Alain BODOY | IFREMER, Rue de l'Ile d'Yeu,B.P. 1049 - 44037 Nantes cedex 01 |
| Pio FIORONI | Universität Münster, Institut für Spezielle Zoologie und Vergleichende Embryologie, Hüfferstraße 1, D-48149 Münster, Allemagne |
| Serge GOFAS | Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Biologie des Invertébrés Marins et Malacologie, 55 rue de Buffon, 75005 Paris |
| Marcel LE PENNEC | Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences , 6 avenue Le Gorgeu, 29283 Brest cedex |
| Pierre LUBET | Laboratoire de Zoologie, I.B.B.A., Faculté des Sciences, 14032 Caen cedex |
| Mathieu POULICEK | Laboratoire d'Ecologie marine, Institut de Zoologie, Université de Liège, 22 Quai van Beneden, B - 4020 Liège, BELGIQUE |
| JeanTARDY | Laboratoire de Biologie, Biochimie marines et Phytoécologie, IUT, Rue François de Vaux de Foletier, 17026 La Rochelle cedéx |
| Nardo VICENTE | C.E.R.A.M., Faculté des Sciences et Techniques de Saint Jérôme, 13397 Marseille cedex 13 |

Directeur de la publication : Patrick ARNAUD, Président de la S.F.M.
Coordonnateur de ce volume : Serge GOFAS

Société Française de Malacologie - siège : 55, rue Buffon, F-75005 Paris ISSN: 0397.765 X
Imprimé en Espagne par Imprenta Loredo (Gijón) - Achevé d'imprimer le 31 mars 1998

*Sommaire*

PATRICK SOLETCHNIK , PHILIPPE GOULLETQUER , NATHALIE COCHENNEC , TRISTAN RENAULT & PHILIPPE GEAIRON
Ecophysiological study of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* naturally infected by a *Chlamydia*-like microorganism: effect of infection level and diet on oyster physiological responses 1

RENÉ ROBERT , JEAN-LOUIS NICOLAS & RONY CONNAN
Action de l'érythromycine et de l'acide oxolinique sur le développement larvaire de la coquille St Jacques *Pecten maximus* 21

RENÉ ROBERT
Nutritional inadequacy of *Nannochloris atomus* and *Stichoccocus bacillaris* for the oyster *Crasssotrea gigas* (Thunberg) larvae 29

CHRISTIANE VAREILLE-MOREL, DANIEL RONDELAUD & GILLES DREYFUSS
*Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae): preliminary findings on the ecology and ethology of populations living along river banks 35

HATEM BEN OUADA , MOHAMED NEJIB MEDHIOUB , AMEL MEDHIOUB , HANEN JAMMOUSSI & MOHAMED BEJI
Variabilité morphométrique de la palourde *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) le long des côtes tunisiennes 43

PIERRE LUBET & PETER DARE
Reproduction de la Coquille St.Jacques sur les côtes de Cornouaille et du S.W. de l'Angleterre (U.K.); comparaison avec d'autres secteurs de l'aire de répartition de l'espèce 57

MARC VIANEY-LIAUD
La reproduction chez un Mollusque hermaphrodite simultané, la planorbe *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastéropode, Pulmoné) 67